Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Experimentelle Untersuchungen über die Phagocytoseleistung des RES nach Applikation toxischer Substanzen aus verbrannter und unverbrannter Haut am Modell der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Ekkehard Lukas
aus Stuttgart

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Experimentelle Untersuchungen über die Phagocytoseleistung des RES nach Applikation toxischer Substanzen aus verbrannter und unverbrannter Haut am Modell der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Ekkehard Lukas
aus Stuttgart

1984

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Dr. K. H. Schmidt
2. Berichterstatter:	Professor Dr. L. Koslowski

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Dr. K.H. Schmidt herzlich für die Überlassung des Themas und seine verständnisvolle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.
Für technische Unterstützung bei der Verarbeitung der Radioisotope danke ich Herrn Dr. Anger sowie Herrn Dr. Sugg.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einführung	2
2. Grundlagen	3
2.1. Die Verbrennungskrankheit	3
2.2. Das Verbrennungstoxin	5
2.3. Das Reticuloendotheliale System	6
2.3.1. Aufbau des RES	6
2.3.2. Funktion des RES	7
2.3.3. Meßmethoden der Phagocytenleistung des RES	10
2.3.4. Stimulation und Depression des RES	11
3. Hypothesen und methodische Vorüberlegungen	12
3.1. Hypothesen	12
3.1.1. Verbrennungstoxin	12
3.1.2. Infektion	12
3.2. Methodische Vorüberlegungen	13
3.2.1. Versuchsaufbau	13
3.2.2. Toxinnachweis	13
4. Experimenteller Teil	15
4.1. Material und Methode	15
4.1.1. Material	15
4.1.2. Methoden	17
4.2. Darstellung und Interpretation der Ergebnisse	21
4.2.1. Toxixitätsbestimmung	21
4.2.2. Versuchsreihe I mit markiertem Toxin	22
4.2.3. Versuchsreihe II mit unmarkiertem Toxin	31
5. Diskussion	41
5.1. Markierungsmethode und Toxinverteilungsmuster	41
5.2. Wirkung des Toxins	43
5.3. Wirkungsmechanismen bei RES-Depression	45
5.4. RES-Depression und Infektion	51
6. Zusammenfassung	53
7. Meßwerte	54
8. Literaturverzeichnis	61

1. EINFÜHRUNG

Den Anstoß zu dieser Arbeit gaben eine Reihe von wissenschaftlichen Veröffentlichungen der Basler Forschungsgruppe um Schoenenberger, worin diese über die Isolierung eines angeblichen Verbrennungstoxins berichtet hatte. Aufgrund des allgemeinen Interesses, daß die Frage nach einem Verbrennungstoxin in der Medizin besitzt, wurden in der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen auf der Grundlage dieser Veröffentlichungen weitere Forschungsvorhaben durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen entstand die vorliegende Arbeit, die sich mit einigen speziellen Fragen aus dem weiten Spektrum der Verbrennungsforschung befaßt.

Zunächst wird ein kurzer Überblick über den behandelnden Themenbereich gegeben. Im Anschluß daran werden die experimentellen Untersuchungen im Detail beschrieben und deren Ergebnisse vorgestellt. Zum Abschluß wird versucht, diese Ergebnisse in die allgemeine Verbrennungsforschung einzuordnen.

2. GRUNDLAGEN

2.1. Die Verbrennungskrankheit

Die thermische Schädigung der Haut führt je nach Umfang der Schädigung zu leichten bis schwersten Störungen des gesamten, von der Hitzeeinwirkung betroffenen Organismus. Die Vielzahl der resultierenden krankhaften Erscheinungen wird unter dem Begriff der Verbrennungskrankheit zusammengefaßt.

Bei Verbrennungen größeren Ausmaßes kommt es initial infolge heftiger Schmerzen zu einem Schockzustand Dieser wird durch einen erhöhten Sympatikotonus ausgelöst. Die medikamentöse Behandlung dieses Schockzustandes stellt kein Problem dar, so daß daß dieser kaum jemals Ursache eines tödlichen Ausganges wird (44).

Die Verbrennungskrankheit selbst wird allgemein in 3 Phasen unterteilt. Die erste Phase der Permeabilitätsstörung wird durch eine massive Histaminausschüttung eingeleitet. Eine Stunden nach dem Verbrennungs rauma tritt die Wirkung von Proteasen und Proteolyseprodukten verstärkend hinzu. Im Verbrennungsgebiet selbst entsteht durch direkte Hitzeeinwirkung Durchlässigkeit der Membranen für Eiweißmoleküle, die wiederum Wasser mit sich ziehen. Durch die genannten Vorgänge strömen große Mengen von Wasser, Elektrolyten und Eiweiß in das hitzegeschädigte Gewebe und bilden ein massives Wundödem. Zu diesem Flüssigkeitsverlust nach innen addiert sich ein Flüssigkeitsverlust nach außen. Infolge Verlustes der intakten Haut als Schutzschicht steigt die Verdunstung des Körperwassers an der Oberfläche auf ein Vielfaches der Norm an und entzieht so dem Organismus weitere Flüssigkeit und Energie in Form von Wärme.
Hämatokrit und Blutviskosität steigen an und können zu Sekundärschäden durch Hypoxie der Gewebe führen. In dieser Phase wirkt eine gut bilanzierte Infusionstherapie meist lebensrettend (63).

Nach etwa 48 Stunden geht die Ödemphase allmählich in die Resorptionsphase über. Mit der rückströmenden Flüssigkeit gelangen zahlreiche bekannte, aber auch bislang noch nicht identifizierte Substanzen aus dem zerfallenden Gewebe in die Blutbahn. Dabei handelt es sich sowohl um native als auch durch Hitzeeinwirkung und durch im Wundgebiet aktivierte Proteasen veränderte Zellbestandteile. Diese Substanzen müssen durch aktive Leistungen des Organismus wieder aus dem Blut eliminiert werden. Da diese Substanzen unter physiologischen Bedingungen nicht ins Blut gelangen,werden sie dort als Fremdkörper erkannt und vom Reticuloendothelialen System phagozytiert. Damit wird ein gutes Funktionieren der Entgiftungsmechanismen zum ausschlaggebenden Faktor für den weiteren Verlauf der Verbrennungskrankheit.

In der 3. Phase der Verbrennungskrankheit entscheidet sich das Schicksal des Patienten. Im günstigsten Fall kommt es allmählich zu einer narbigen Abheilung der Verbrennungswunde. In vielen Fällen jedoch kommt es trotz optimaler Wundbehandlung nach wenigen Tagen bis 2 Wochen zu einer schweren Allgemeininfektion mit septischem Krankheitsverlauf, die häufig letal endet. Trotz optimaler Infusionstherapie und antibiotischer Behandlung sterben noch immer die Mehrzahl der Patienten nach ausgedehnten Verbrennungen in dieser Phase (siehe Abbildung 1).

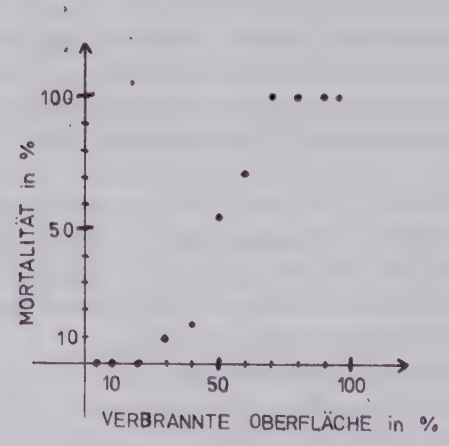

Abb. 1
Mortalitätsrate von Verbrennungspatienten nach A.T. Ramirez (64) (1970)

2.2. Das Verbrennungstoxin

Fortschritte auf dem Gebiet der Antibiotika und verbesserte medizinische und hygienische Voraussetzung konnten in den letzten Jahren in den USA keine Verbesserung der Überlebenschancen von Verbrennungspatienten erreichen (10). Dasselbe gilt für Europa. Die Patienten sterben meist zwischen dem 10. und 30. Tag nach dem Verbrennungstrauma. Pathologisch-anatomische Untersuchungen ergaben lokalisierte Infektionen oder eine generalisierte Spätsepsis als Todesursache (81). Warum es trotz adaequater Therapie immer wieder zu diesen nicht beherrschbaren Infektionen kommt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt, Da es sich bei dem fraglichen Erregerspektrum im allgemeinen um sonst wenig pathogene Keime handelt, muß auf der Erregerseite eine veränderte Virulenz der Mikroorganismen, auf der Wirtsseite eine gestörte Abwehrfunktion als Ursache in Betracht gezogen werden.

Diese Überlegungen führten viele Wissenschaftler zu der Annahme einer abakteriellen toxischen Schädigung nach Verbrennungen (45) als Ursache. Diese Vermutung wurde in Grundzügen bereits im vorigen Jahrhundert nach experimentellen Befunden von Wertheim (98) und Avdakoff (7) diskutiert. Dabei soll durch die Hitzeeinwirkung im Wundgebiet eine toxische Verbindung entstehen, die nach erfolgter Resorption die deletären Folgen verursacht. Wenn auch viele Untersuchungsergebnisse seit damals auf ein derartiges Verbrennungstoxin hinzudeuten scheinen, so konnte doch dessen Existenz nie zweifelsfrei nachgewiesen werden. Ein Überblick über die Toxinforschung aus dem Jahre 1976 (87) macht die Fragwürdigkeit dieser "Toxinnachweise" deutlich.

Mit der erstmaligen Isolierung und Beschreibung eines Verbrennungstoxins durch Schoenenberger (83) wurde die Diskusion über den Pathomechanismus der Verbrennungskrankheit neu belebt. Dieses zunächst bei in vitro Versuchen gewonnene Verbrennungstoxin konnte später auch bei in vivo Versuchen nac gewiesen werden (89). Inzwischen wurde auch von anderen Forschungsgruppen über die Isolierung eines Verbrennungstoxins berichtet (34).

2.3. Das Reticuloendotheliale System

2.3.1. Aufbau des RES

Im Organismus höherer Tiere und des Menschen finden sich eine Vielzahl heterogener mononukleärer Zellen mit phagozytären Eigenschaften, genannt Makrophagen, deren gemeinsame Funktion es ist, großmolekulare Substanzen durch Phagozytose bzw. Pinozytose aufzunehmen und zu Vernichtung. Sie wirken damit als Klärwerk des Organismus. Aschoff hat zum erstem Mal diese unterschiedlichen Zellen zu einer funktionellen Einheit zusammengefaßt und ihr den Namen Reticuloendotheliales System gegeben (4). Nach seiner Definition gehören zum RES im engeren Sinne "die Reticulumzellen der Milzpulpa, der Rindenknötchen und der Markstränge der Lymphknoten und des lymphatischen Systems; die Reticuloendothelien der Lymphsinus der Lymphknoten, der Blutsinus der Milz, der Kapillaren der Leberläppchen, des Knochenmarks, der Nebennierenrinde und der Hypophyse". Nicht zum RES gehören die Leukozyten. Neben der Bezeichnung RES existieren heute noch andere Überbegriffe wie Reticulohistiocytäres System (91) oder Mononuclear Phagozytose System (48)mit weitgehend identischer Bedeutung.

Die Makrophagen werden in fixierte und freie unterteilt. Freie Makrophagen finden sich vor allem im Blutkreislauf und in entzündlichen Exsudaten. Die fixierten Makrophagen finden sich vornehmlich in den parenchymatösen Organen, aber auch im Bindegewebe und im ZNS.

Die Leber ist das an Makrophagen reichste Organ. Etwa 35 % aller Leberzellen sind Makrophagen. Die Makrophagen der Leber heißen nach ihrem Entdecker Kupffer'sche Sternzellen. Die Milz enthält zahlenmäßig wenig Makrophagen, jedoch ist sie bezogen auf ihr Eigengewicht das makrophagenreichste Organ. Die Makrophagen von Leber und Milz zusammen bilden ca. 85 % der ortsständigen RES-Zellen. Die Lunge enthält RES-Zellen in Form der interstitiellen Bindegewebszellen der Alveolarwand, als Sorokinzellen im Alveolarepithel und als freie Zellen im Alveolarlumen (93).

Das RES befindet sich ständig im Umbau und in Erneuerung. Dabei sind die Makrophagen Endstufe einer Zellreihe, die ihren Ursprung in den Promonozyten aus dem Knochenmark hat (92).

Unter normalen Bedingungen teilen sich die Makrophagen nicht mehr, sondern werden bei ihrem Absterben durch neu aus dem Knochenmark einwandernde Zellen ersetzt, die sich zu reifen Makrophagen differenzieren. Für die Kupffer'schen Sternzellen der Leber wurde ein mittlerer Umsatz von 21 Tagen berechnet, das heißt, innerhalb 3 Wochen findet eine vollständige Erneuerung der Zellpopulation statt (22). Andere Autoren sprechen von einer Überlebenszeit von 40 bis 60 Tagen (92). Nach Stimulierung des Makrophagensystems kommt es jedoch auch zu einer Teilung und Vermehrung reifer Makrophagen (99).

2.3.2. Funktion des RES

Mit Hilfe immunologischer Mechanismen sind Mensch und Tier in der Lage von außen in den Organismus eingedrungene Fremdstoffe oder entartetes bzw. defektes Eigengewebe zu erkennen und zu bekämpfen. Das RES ist Teil dieses Immunsystems.

Unter physiologischen Bedingungen beseitigen die Zellen des RES überalterte oder beschädigte Erythrozyten sowie Stoffe der Blutgerinnung. Dabei speichern sie das freiwerdende Eisen und geben es bei Bedarf an das Knochenmark zur Neubildung von roten Blutzellen ab. Außerdem wirken sie mit beim Metabolismus körpereigener Substanzen wie dem Fettstoffwechsel, der Synthese von Harnstoff, lysosomalen Enzymen sowie der Pyrogene. Auch synthetisieren sie C4 und vermutlich noch andere Komponenten des Komplementsystems. Unter pathologischen Bedingungen phagozytieren sie Mikroorganismen, Toxine, Tumorzellen und unzerstörbare Fremdpartikel. Im Zusammenwirken mit B- und T-Lymphozyten sind sie an der Immunantwort beteiligt.

Im Zusammenhang mit unserer Arbeit interessiert vor allem die Phagozytose von Fremdmaterial, die zugleich die am längsten und besten bekannte Funktion der RES-Zellen ist.

Während die freien Makrophagen durch einen als Chemotaxis bezeichneten Vorgang an ihren Wirkungsort gelangen, müssen zur Phagozytose durch die ortsständigen Makrophagen die Partikel zu den Zellen transportiert werden. Transportmedium ist das Blut. Die ortsständigen Makrophagen liegen daher vorwiegend als oberste Zellschicht auf oder eingebettet in die Endothelschicht der Blutbahn, vor allen in den Lebersinusoiden. Die Oberflächen der Kupffer'schen Sternzellen sind unregelmäßig und tragen filopodienähnliche Zellfortsätze. Diese können zum Teil auch die Lumen der Sinusoide kreuzen und mit den gegenüberliegenden Kupffer'schen Sternzellen in Kontakt treten. Auf diese Weise können sie als Sinusoidsphinkter wirken. Dadurch wird die Aufnahme von im Blut zirkulierenden Partikeln erleichtert (95).

Der gesamte Phagozytosevorgang kann in 3 Abschnitte unterteilt werden: Anlagerung der Teilchen an die Zelloberfläche, Aufnahme in die Zelle und Abbau oder Speicherung des aufgenommenen Materials.

Im Blut zirkulierende Partikel bleiben in den Lebersinusoiden hängen, so bald sie mit der Wand der Sinusoide, das heißt den dort befindlichen Kupffer'schen Sternzellen Kontakt bekommen. Dieser Kontakt wird begünstigt durch Interaktion dieser Partikel mit dem zirkulierenden Blut. Dabei werden diese Partikel so bald sie ins Blut gelangen durch im Blut vorhandene Substanzen "überzogen" und wie in einer Matrix zusammengehalten. Das Ergebnis sind Gebilde die die mehrfache Größe der eigentlichen Partikel besitzen (16). Dieser Vorgang wird Opsonisierung genannt. Wahrscheinlich ist die Aufnahme der Partikel in die Zelle ohne vorherige Opsonisierung nicht möglich. Es handelt sich dabei um Eiweißkörper genannt Opsonine (23, 69). Auch Komplement scheint hierbei eine bedeutende Rolle zu spielen, vor allem das Spaltprodukt C3b (33, 84).

Zur Erkennung der Fremdstoffe sind die Makrophagen an ihrer Oberfläche mit speziellen Rezeptoren ausgestattet. Neurere Unter-

suchungen zeigen, daß die Makrophagenoberfläche 3 Arten von Rezeptoren enthält: Die FC-Rezeptoren zur Bindung von Immunglobulin (29), die C3-Rezeptoren für die dritte Komponente des Komplements (57) sowie einen sogenannten dritten Rezeptor für eine nicht spezifische Bindung von Proteinaggregaten (90).

Die Anlagerung der Teilchen an die Makrophagenoberfläche ist energieunabhängig (21, 94). Der zweite Schritt, die Inkorporation der Partikel in das Zellinnere, ist jedoch energieabhängig. Durch Kontakt mit diesen Fremdstoffen entstehen Ladungsänderungen an der Oberfläche der Phagozyten, die zur Stoffwechselaktivierung führen. Es steigt die Sauerstoffaufnahme und es kommt zur beschleunigten Glykolyse (84).

Durch amöboide Bewegungen der Phagozyten werden die angelagerten Partikel umfaßt und es kommt zur pinozytotischen Einstülpung der Zellmembran. Dabei werden die Partikel so umschlossen, daß sie nach Aufnahme in das Zellinnere von Membranmaterial umhüllt sind. Das so gebildete Phagosom trifft durch Bewegung des Zytoplasmas mit Lysosomen zusammen, die eine Vielzahl lytischer Fermente enthalten. Phagosom und Lysosom vereinigen sich unter Vermischung der Zellinhalte zu einem Phagolysosom. Auf diese Weise entsteht ein "Verdauungsbläschen" in dem die lysosomalen Enzyme die aufgenommen Partikel zu kleinen Einheiten abbauen. Nach experimenteller Blockade des RES finden sich angeschwollene Kupffer'sche Sternzellen mit unregelmäßigen Vakuolen, die große Mengen der injizierten Substanz als unregelmäßig aggregierte Partikel enthalten (100). Zum Teil werden auch beim Abbau der Partikel zytotoxische Substanzen frei, die die Phagozyten schädigen oder töten können (100). Auch gibt es Substanzen, die durch diese Enzyme nicht abgebaut werden können. Konnten die Partikel abgebaut werden, kommt es zur Ausstoßung der Abbauprodukte genannt Zelldefäkation.

Die Anhaftung der Partikel an die Zelloberfläche geht sehr rasch vor sich. Bei elektronenoptischen Untersuchungen finden sich 3 Minuten nach i.v.Injektion kolloidalen Goldes große Mengen an der Membran der Kupffer'schen Sternzelle haftend (100). Untersucht man die Leber auf die Phagozytose derartiger Partikel,

so werden diese Partikel im allgemeinen spezifisch von den Kupffer'schen Sternzellen aufgenommen, wenn ihr Durchmesser mehr als 0,1 μ^3 beträgt. Kleinere Partikel findet man auch in anderen Endothelzellen (100).

Die benötige Zeit für die Inkorporation der Teilchen in die Zelle schwankt je nach Material zwischen wenigen Sekunden und vielen Stunden. Kohlepartikel zum Beispiel werden schon Minuten nach Kontakt mit den Oberflächenzellen der Lebersinusoide in Makrophagen gefunden (16).

Die Makrophagen spielen eine Helferrolle bei der Ausbildung der Immunantwort. "Hat der Makrophage den Fremdstoff augenommen, so wird nicht die Gesamtmenge intrazellulär verdaut, sondern ein Teil bleibt unversehrt erhalten. Dieser Rest könnte durch Bindung an Makrophagen RNS die aktive Form sein, die an die eiweißproduzierenden Zellorganellen als Matrize weitergegeben wird." Diese Aufbereitung von Fremdkörpern zur Weitergabe an das spezifische Abwehrsystem in besonders immunogener Form stellt jedoch keinen absolut notwendigen Vorgang zur Auslösung der Immunantwort dar. Auch ohne Beihilfe der Makrophagen kann eine Immunantwort ausgelöst werden (84).

2.3.3. Meßmethoden der Phagocytoseleistung des RES

Die Funktion des RES ist quantitativ bestimmbar; das Prinzip der Messung ist einfach. Substanzen, die selektiv vom RES phagozytiert werden, werden in definierten Mengen intravenös appliziert. Die Verschwinderate aus dem Blut wird durch wiederholte Blutentnahmen unter Bestimmung der Konzentration der betreffenden Substanz im Blut ermittelt. Diese Werte ergeben in einem linearen Koordinatensystem eine Exponentialkurve erster Ordnung (13). Saba weist darauf hin, daß der exponentielle Abfall nur für den Anfangsteil der Kurve gilt und sie zum Ende hin abflacht. Aus dem exponentiellen Teil der

Kurve kann ein Phagozytoseindex berechnet werden nach der Formel $K = (\ln C1 - \ln C2)/(t2 - t1)$, wobei C1 und C2 die Konzentrationswerte der Testsubstanz zum Zeitpunkt t1 bzw. t2 sind. Dieser substanzabhängige Phagozytoseindex eignet sich als Vergleichswert bei Versuchsreihen. Leider ist diese Messung an einem Objekt nicht beliebig wiederholbar, da durch hohe Gaben der als Testsubstanz verwendeten Partikel die Phagozytose einer zweiten Dosis derselben Substanz vorübergehend gehemmt wird, das heißt die erste Untersuchung das Ergebnis einer zweiten Messung verfälschen kann (72).
Als Testsubstanz kommen verschiedene Stoffe in Frage. Gängige Bestimmungsmethoden verwenden Farbstoffe wie Kongorot, Kohlepartikel, Fremderythrozyten, Fettemulsionen, Technetium-Schwefel-Kolloide, kolloidáles Gold oder Chromphosphat. Substanzen, die nicht direkt im Blut bestimmt werden können, müssen radioaktiv markiert werden. Neuerdings wird 125-J-markiertes hitzedenaturiertes Albumin verwendet, mit dem man die Funktion des RES beim Menschen gut messen kann (19).

2.3.4. Stimulation und Depression des RES

Viele Faktoren beeinflussen die Funktion des RES: So findet man eine Minderfunktion unter anderem nach Operationen (86), bei traumatischem Schock (42) und bei Verbrennungen (22,65). Auch experimentell kann die Funktion des RES beeinflußt werden. Einige Substanzen sind dafür bekannt, daß sie eine Depression des RES herbeiführen, so zum Beispiel Thorotrast (80) und Methylpalmitat (26). Andere Substanzen wie Glucan (101), Zymosan (66), Östrogen (58) und Corynebacterium parvum (43) bewirken im Experiment eine Stimulierung des RES.

3. HYPOTHESEN UND METHODISCHE VORÜBERLEGUNGEN

3.1. Hypothesen

3.1.1. Verbrennungstoxin

Die strenge Relation zwischen der verbrannten Hautfläche und der Letalität des betroffenen Organismus führten zum Intoxikationsmodell der Verbrennungskrankheit. Die Wirkung der vorliegenden Substanz - Toxin genannt - wurde untersucht unter der Annahme, daß es sich dabei tatsächlich um ein in vivo unter Hitzeeinwirkung entstehendes Verbrennungstoxin handelt, das seine toxische Wirkung durch die thermische Umwandlung erfährt. Dessen native Vorstufe aus unverbrannter Haut - Nativ genannt - dürfte dann die schädlichen Wirkungen des Toxins nicht oder nur in geringerem Umfang zeigen.

3.1.2. Infektion

Die hohe Infektionsrate der Verbrennungspatienten, die letztendlich zu deren Tode führt, soll Folge der Intoxikation sein. Das RES, als wichtiger Bestandteil der körpereigenen Abwehr, könnte hierbei die entscheidente Rolle spielen. Es sollte daher untersucht werden, ob die oben genannte Substanz eine Minderfunktion oder gar den völligen Ausfall des RES bewirkt. Damit wäre ein neuer Therapieansatz der Verbrennungskrankheit gegeben.

3.2. Methodische Vorüberlegungen

3.2.1. Versuchsaufbau

Vor Beginn der eigentlichen Versuche sollte zunächst in grobgerasterten Vorversuchen mit kleinen Versuchszahlen ein sinnvoller technischer Versuchsaufbau sowie eine wirksame Dosis des Verbrennungstoxins und ein geeigneter Zeitraum zur Untersuchung seiner Wirksamkeit gefunden werden. Mit dem auf diese Weise gefundenen Untersuchungsmodus sollten dann nach statistischen Maßstäben die Versuche durchgeführt werden.

Zur möglichst exakten Nachahmung der Vorgänge beim Verbrennungstrauma sollte ein in vivo Versuchsmodel zur Anwendung kommen. Wir stützten uns dabei weitgehend auf einen von Schildt (74) beschriebenen Versuchsaufbau , der für die vorliegende Fragestellung besonders geeignet erschien.

Eine weitere Versuchsreihe sollte die Ergebnisse unter in vitro Bedingungen reproduzieren, da hierbei die einzelnen Parameter besser isoliert und untersucht werden können. Dadurch erhofften wir uns einen Einblick in die Wirkungsmechanismen der beobachteten Veränderungen. Dabei entschieden wir uns wiederum für einen Versuchsaufbau nach Schildt (76) mit welchem dieser sehr interessante und detailierte Ergebnisse erzielen konnte Dieser Versuchsaufbau hat zudem den Vorteil, daß weitgehend die selben Materialien wie bei dem erwähnten in vivo Versuch zur Anwendung kommen.

3.2.2. Toxinnachweis

Für die angestrebten Untersuchungen war es notwendig, den Toxingehalt verschiedener Organe zu bestimmen. Da keine direkten Meßmethoden existieren, mußte das Toxin markiert werden Die Verwendung eines Radioisotopes zur Markierung war naheliegend.

An das Markierungsisotop mußten dabei folgende Forderungen gestellt werden:

1. Es sollte ohne das Toxin chemisch zu verändern eine feste Bindung mit diesem eingehen.
2. Es sollte eine mittlere bis lange Haltbarkeit besitzen, um eine stärkere Aktivitätsabnahme während der Versuche und damit verbundene Meßabweichungen zu vermeiden.
3. Es sollte im Hinblick auf die angestrebte Versuchsanordnung ein von 51-Cr gut trennbares Emissionsspektrum besitzen; ein Gamma-Strahler war jedoch wünschenswert, um die Messungen gemeinsam im selben Zähler vornehmen zu können.

125-Jod erschien am besten geeignet, da eine biochemische Analyse des Verbrennungstoxins (1) einen genügend hohen Anteil an Tyrosin und Histidin ergeben hatte, um den Versuch einer Radiojodierung zu rechtfertigen.

Damit das Jod überhaupt mit den Tyrosinmolekülen des Toxins reagieren kann, mußte dieses zunächst von seinem Lipidmantel befreit werden. Schwierigkeiten bereitete ferner die fehlende Wasserlöslichkeit des Toxins. Um trotzdem eine ausreichende Markierung zu erhalten, wurde deshalb mit einem hohen Überschuß an Radiojod gearbeitet. Zur Vermeidung größerer pH-Verschiebungen wurde zur Reaktionsbeschleunigung Chloramin T eingesetzt. " Chloramin T setzt Hypojodid und elementares Jod unmittelbar in der schwach alkalischen Proteinlösung frei und reoxidiert das allfällig auftretende HJ wieder " (41).

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Material und Methode

4.1.1. Material

4.1.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 230 NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts aus der Tierzuchtanstalt Sulzfeld mit einem durchschnittlichen Gewicht von 24 g. Die Tiere wurden in Sammelkäfigen zu je etwa 14 Tieren gehalten und bekamen Trockenfutter und Wasser ad libitum.

4.1.1.2. Verbrennungstoxin

Das Verbrennungstoxin stammte aus den Forschungslaboratorien der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen. Es wurde entsprechend der Angaben von Cueni (25) aus verbrannter Mäusehaut isoliert. Lediglich auf die abschließende Reinigung durch Ultrazentrifugation wurde verzichtet.

Nach dem selben Verfahren wurde aus unverbrannter Haut die Nativ genannte Substanz gewonnen.

Die Endprodukte dieser Aufarbeitungen lagen in lyophilisierter Form vor und waren bei physiologischem pH in Wasser unlöslich. Zu Injektionszwecken wurden sie mit einem Dispergierungsgerät in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Elektronenoptische Untersuchungen dieser beiden Substanzen von Schoenenberger et. al. (1) ergaben, daß es sich um Lipidproteinkomplexe handelt. Während Nativ die monomere Form dieses Komplexes darstellt, handelt es sich bei dem Verbrennungstoxin um die polymerisierte Form desselben Makromoleküls.

4.1.1.3. RES-Testsubstanz

Zur Funktionsprüfung des RES wurden Fremderythrozyten verwendet. Als Markierungssubstanz für diese Erythrozyten eignet sich 51 Cr besonders gut (32). Die Erythrozyten wurden nach der Standardmethode der Universitätsstrahlenklinik Tübingen markiert:

> Frischblut wird mit ACD-Lösung im Verhältnis 4:1 in einer Spritze aufgezogen und pro 10 ml Suspension mit 160 Mikrocurie 51 Cr versetzt. Die Mischung wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert, um das ungebundene 51 Cr zu entfernen. Der Überstand wird verworfen und die Zellen dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Für die Versuche wurden die markierten Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung auf eine Hämoglobinkonzentration von 20 g pro 100 ml resuspendiert (74). Wir verwendeten bei allen Versuchsreihen Frischblut des selben Spenders mit der Blutgruppe A1, Rh positiv. Durch die Verwendung von Frischblut konnte ein nennenswerter Anteil an hämolysiertem Blut ausgeschlossen werden, was bekanntlich zu Markierungsfehlern geführt hätte. Im folgenden Text werden die markierten Erythrozyten 51-Cr-RBC genannt.

4.1.1.4. Meßapparatur

Für Messungen der Radioaktivität unserer Proben stand ein Gamma-Counter, Modell Gamma-Szint-BF 5000 GF, zur Verfügung. 51 Cr wurde im Bereich 290 bis 370 KeV, 225 J im Bereich 20 bis 50 KeV gemessen. Bei Betrachtung der Emissionsspektren wird deutlich, daß diese Meßbereiche eine optimale Trennung der beiden Radioisotope bei möglichst geringen Zählverlusten garantieren.

4.1.2. Methoden

4.1.2.1. Markierung des Verbrennungstoxins

Protein- und Lipidanteil des Toxins wurden mit Alkohol, Äther und Chloroform in aufsteigender Reihe getrennt. 1 mg des delipidierten Toxins wurde in 50 Mikroliter 0,9 %iger NaCL gut dispergiert. Diese Suspension wurde einem Ansatz von 100 Mikroliter Phosphatpuffer, 1 mCie Na-125-J in 5 Mikroliter NaCl und 25 Mikroliter Chloramin T zugesetzt. Nach 2 Minuten wurde die Reaktion durch Zusatz von 25 Mikroliter NaHSO3 gestoppt. Der gesamte Ansatz wurde zur Abtrennung des ungebundenen Jods 5 Tage in einem Serva-Visking-Dialyseschlauch (Wandstärke 0,02 mm) gegen Wasser dialysiert. Um das Volumen im Dialyseschlauch auf ein vernünftiges Maß zu erhöhen und die Verluste an markiertem Toxin bei der Leerung des Dialyseschlauches zu vermindern wurde dem Markierungsansatz vor Beginn der Dialyse der unmarkierte Anteil des für die Versuchsreihe benötigten delipidierten Toxins als NaCl-Suspension zugegeben. Nach erfolgter Dialyse wurde diese Toxinsuspension durch Zugabe von NaCl isoton gemacht und mit dem vorher entfernten Fettanteil wieder relipidiert.

Als Erfolgskontrolle der Markierungsmethode diente folgender Vorversuch. Einer kleinen Gruppe von Versuchstieren wurde eine geringe Menge des markierten Toxins i.p. appliziert; einer Kontrollgruppe wurde dieselbe Aktivitätsmenge in Form des Dialysebades, das heißt als freies Jod verabreicht. Nach wenigen Stunden wurde die Leber der Versuchstiere auf ihren Gehalt an Radiojod untersucht. Während die Leber der Tiere aus der Toxingruppe 20 % der applizierten Aktivität enthielt, fand sich in der Leber der Kontrolle nur 1 %. Damit galt als gesichert, daß das Radiojod tatsächlich an das Toxin gebunden worden war.

4.1.2.2. Speicherung der Testsubstanz in RES-Zellen

In der ersten Versuchsreihe wurde die Speicherung von Toxin und 51-Cr-RBC in verschiedenen Organen der Versuchstiere gemessen.

Dabei wurde den Mäusen 4,7 mg markiertes Toxin intraperitoneal und 8 Stunden später 50 Mikroliter 51-Cr-RBC intravenös appliziert. 1,5 Minuten bzw. 5 Minuten nach Injektion der Testerythrozyten wurden die Tiere durch Genickbruch getötet, die zu untersuchenden Organe Leber, Milz, Lunge, Nieren und Thymus in toto entnommen und deren Gehalt an 125 Jod sowie 51 Chrom im Gamma-Counter gemessen. Bei Kontrollgruppen wurde nur markiertes Toxin oder nur 51-Cr-RBC appliziert, ansonsten wurde gleich verfahren.

4.1.2.3. Verschwinderate einer Testsubstanz aus dem Blut

In der zweiten Versuchsreihe wurde zusätzlich zur Organspeicherung die Verschwinderate der Testerythrozyten aus dem Blut bestimmt. Beides kann mit einer Versuchsanordnung nach Schildt (55) an dem gleichen Tier untersucht werden.

Die Versuchstiere wurden mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal 2,5 mg pro Tier i.p.) narkotisiert, um eine Serie von Blutentnahmen durchführen zu können. Die Standardtestdosis von 150 Mikroliter 51-Cr-RBC entsprechen etwa 10 mg Hämoglobin und 1,1 Mikrocurie 51 Cr wurde der Maus in die Schwanzvene injiziert. Die gleiche Menge derselben Präparation diente als Standard. Nach 0,5 Minuten, 1,5 Minuten und 4 Minuten wurden jeweils 20 µl Blut mit Hilfe eines Kapillarröhrchens aus dem Plexus ophthalmicus entnommen. Die Kapillarröhrchen mit den Blutproben wurden in Reagenzgläsern mit 2 ml Aqua dest ausgewaschen und die Radioaktivität des auf diese Weise hämolysierten Blutes in einem Gamma-Counter gemessen. 5 Minuten nach Injektion der 51-Cr-RBC wurden die Tiere wieder durch Genickbruch getötet, Leber und Milz der Tiere entnommen und deren Gehalt an 51 Cr bestimmt.

8 Stunden vor dieser Untersuchung des RES wurde der Versuchsgruppe 5 mg Toxin i.p. pro Tier verabreicht. Eine zweite Gruppe erhielt die gleiche Gewichtsmenge Nativ. Der Kontrollgruppe wurde das gleiche Volumen NaCl gespritzt, um einen eventuellen Einfluß der Streßsituation, bedingt durch die Injektion, zu eliminieren.

4.1.2.4. Speicherung von RES-Zellen in vitro

Die dritte Versuchsreihe sollte die in vivo gewonnenen Ergebnisse unter in vitro Bedingungen nachprüfen. Nach einer von Schildt beschriebenen Versuchsanordnung (77) sollten Leberdünnschnitte von Mäuselebern mit 51-Cr-RBC in einem Nährmedium inkubiert werden und die Phagozytose der Kupffer'schen Sternzellen mit Hilfe der Radiochromspeicherung bestimmt werden.

Die Mäuse wurden mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal 2,0 mg pro Tier i.p.) narkotisiert und anschließend entblutet. Das so gewonnene Blut wurde sofort heparinisiert, um die Gerinnung zu verhindern. Dann wurde die Leber entnommen und unter ständiger Feuchthaltung mit Ringerlösung wurden Leberdünnschnitte angefertigt. Da uns kein Mikrotom zur Verfügung stand, verwendeten wir ein eigens für diesen Versuch konstruiertes Schneidegerät aus 2 parallel angeordneten Rasierklingen. Die Leberschnitte wurden in einem Medium aus 2,25 ml Krebs-Ringerphosphatbicarbonatlösung, 0,25 ml Serum aus dem Mäuseblut und 50 Mikroliter 51-Cr-RBC (2 g%) inkubiert. Das Gefäß wurde mit Carbogen begast, geschlossen und 20 Minuten bei 37°C (Wasserbad) leicht geschüttelt. Danach wurden die Leberschnitte einmal in Saponin und anschließend dreimal in Kochsalzlösung gewaschen, um die von der Leber adsorbierten, aber nicht phagozytierten 51-Cr-RBC durch Hämolyse zu entfernen. Die Menge des phagozytierten Radiochroms wurde in einem Gamma-Counter gemessen, die Leberschnitte anschließend getrocknet und gewogen.

Leider gelang es in mehreren Versuchen nicht, die Leberschnitte funktionsfähig zu erhalten. Es wurden keine nennenswerten Aktivitäten in den Leberschnitten gefunden. Deshalb mußte diese Versuchsreihe ohne Ergebnisse abgebrochen werden.

4.1.2.5. Statistische Methoden

Die Verteilung der Versuchstiere auf die einzelnen Gruppen erfolgte zufällig. Damit sollte eine gleichartige Verteilung der Versuchstiere in den Untersuchungs- und Kontrollgruppen erreicht werden. Ein anderer Verteilungsmodus erschien nicht möglich, da nur wenige biologisch und biochemisch relevante Parameter ohne größeren Eingriff am Organismus der Versuchstiere bestimmbar sind. Speziell die in unseren Versuchen interessierende Funktionsleistung des RES vor Versuchsbeginn kann ohne Beeinflussung der darauffolgenden Versuche nicht bestimmt werden. Dieser Umstand könnte die Ergebnisse verfälschen, da Untersuchungen (2) ergeben haben, daß sich bereits in normalen Rattenpopulationen einzelne Tiere mit RES-Hyperphagozytose finden.

Zum Vergleich der Ergebnisse wurde von den 3 Versuchsgruppen jeweils Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Zur statistischen Prüfung der Frage, ob Toxin-, Nativ- und Kontrollgruppe voneinander verschiedene Grundgesamtheiten bilden, wurde der Signifikanztest nach Student (t-Test) herangezogen. Der t-Test ergibt auch dann verläßliche Werte, wenn er, wie im vorliegenden Fall, im streng statistisch-mathematischen Sinn nicht angewendet werden dürfte (73).

Zur Kontrolle wurde der Wilcoxon-Zwei-Stichproben-Test herangezogen. Dieser ist allgemeingültiger und setzt nur die stetige Verteilung der Werte voraus, was in den vorliegenden Versuchen gegeben ist. Der Wilcoxon-Test bestätigte in den meisten Fällen die Signifikanzen des t-Tests. In einzelnen Fällen fielen sie jedoch um einen Schwellenwert geringer aus. Dies erklärt sich durch die größere Allgemeingültigkeit des Wilcoxon-Testes gegenüber dem t-Test, die durch eine geringere Aussagekraft erkauft wird.

Die im folgenden Text angegebenen P-Werte entstammen der Signifikanzprüfung nach dem t-Test, dessen Anwendung in der medizinischen Literatur allgemein üblich ist.

4.2. Darstellung und Interpretation der Ergebnisse

4.2.1. Toxizitätsbestimmung

Untersucht wurde die Wirkung au steigender Dosen des Verbrennungstoxins von 2,5 mg, 5,O mg und 1O,O mg im Vergleich mit Kochsalz Als Kriterium diente ausschließlich die Speicherung von 51-Cr-RBC in der Leber, da diese am einfachsten zu bestimmen war. Die Gabe von 1O mg Toxin intraperitoneal bewirkte innerhalb 48 Stunden eine hundertprozentige Letalität der Versuchstiere, wohingegen alle übrigen Tiere den gesamten Beobachtungszeitraum von 4 Tagen überlebten. Die Ergebnisse dieser Vorversuche zeigt Abbildung 2. Das Toxin bewirkte eine Depression des RES, die 8 Stunden nach i.p.-Applikation de tlich nachweisbar war, nach 24 is 36 Stunden zur Norm zurückkehrte und dann in eine Hyperphagozytose überging. (die Phagozytosewerte nach 96 Stunden waren aus technischen Gründen leider nicht verwertbar).

Eine Erhöhung der Toxindosis bewirkte eine verstärkte und länger anhaltende RES-Depression. Das Ausmaß der Funktionsschädigung ist also dosisabhängig.

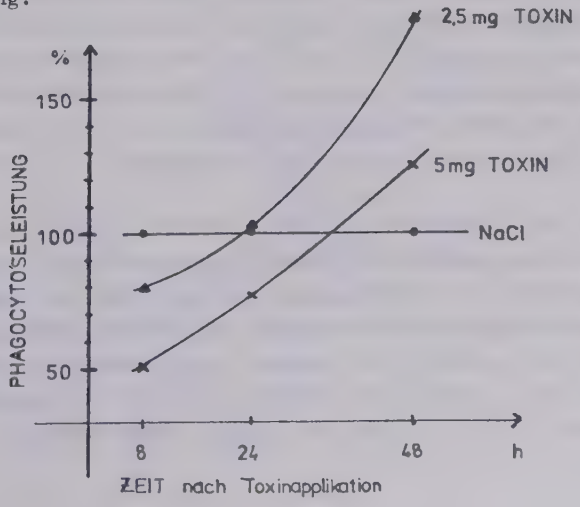

Abb. 2

Dosis-Wirkungskurve des Toxins n = 3

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Testdosis für alle Versuche auf 5 mg Toxin festgesetzt und die Funktion des RES einheitlich nach 8 Stunden untersucht.

Wie sich später herausstellte, schwankte die spezifische Wirkung des Toxins von Aufarbeitung zu Aufarbeitung erheblich. Es müßte daher für jede Charge die spezifische Aktivität bestimmt und die Versuchsdosis neu festgelegt werden. Da ein einfacher Test zur Aktivitätsbestimmung des Toxins nicht bekannt ist, und eine aufwendige Dosis-Wirkungsbestimmung für jede Toxincharge wegen des damit verbundenen hohen Toxinverbrauches und der enormen Kosten nicht vertretbar erschien, wurde die einmal ermittelte subletale Wirkdosis von 5 mg für alle Versuche beibehalten. Es wurde streng darauf geachtet, daß innerhalb einer Versuchsreihe nur Toxin derselben Charge verwendet wurde, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Die Absolutwerte aus verschiedenen Versuchsreihen oder gar aus Arbeiten anderer Autoren können deshalb nicht direkt verglichen werden (12,88).

4.2.2. Versuchsreihe I mit markiertem Toxin

4.2.2.1. Toxinverteilungsmuster

Mit Hilfe des radioaktiv markierten Verbrennungstoxins wurde dessen Aufnahme in die Organe Leber, Milz, Niere, Lunge und Thymus untersucht. Ursprünglich war auch das Herz in diese Untersuchungen mit einbezogen worden, aufgrund der extrem geringen Aktivitäten, die bei den ersten Messungen ermittelt wurden, wurde dieses Organ jedoch von der weiteren Untersuchung ausgenommen.

Bei intraperitonealer Applikation des Toxins wurde nach 8 Stunden in den oben genannten Organen 21 % der eingesetzten Gesamtaktivität aufgefunden. Das Verteilungsmuster zeigt Abbidlung 3. Knapp Dreiviertel des aufgefundenen Toxins wurden in der Leber gespeichert, weitere 15 % in der Milz. Somit entfielen auf die wichtigsten RES-Organe rund 90 % der nachgewiesenen Toxinaufnahme. 4,5 % befanden sich im Thymus und 5,5 % in der Niere. Die Lunge enthielt lediglich 1,5 %.

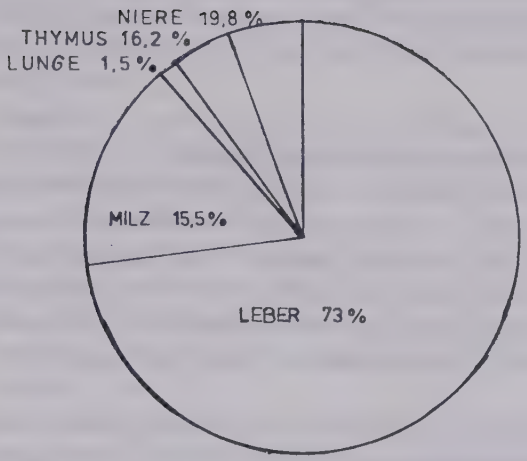

Abb. 3 Toxinverteilung nach i.p. Applikation

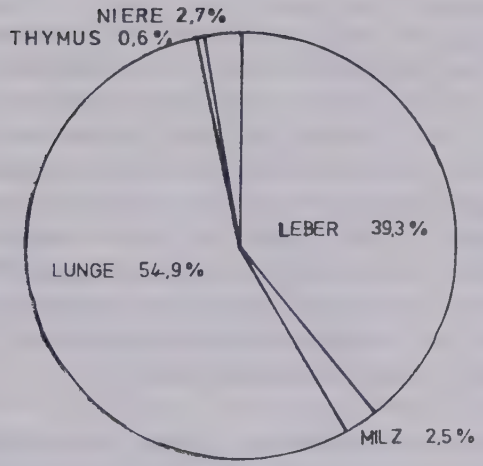

Abb. 4 Toxinverteilung nach i.v. Applikation

Der Verbleib der übrigen Toxinmenge wird im Anschluß an den folgenden Versuch diskutiert.

Nach intravenöser Applikation des Toxins fand sich ein erheblich verändertes Verteilungsmuster (siehe Abbildung 4). Ganz im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch enthielt diesmal die Lunge mit 54,9 % den größten Anteil des Toxins. Die Leberspeicherung ging auf 39,3 % zurück. Parallel dazu nahm die Speicherung in der Milz auf 2,5 %, in der Niere auf 2,7 % und im Thymus auf 0,6 % ab. Insgesamt wurde 8 Stunden nach i.v.-Applikation in den vorher genannten Organen 29 % der applizierten Dosis aufgefunden.

Bei diesem Versuch kam nur schwach markiertes Toxin zur Anwendung, weshalb eine unphysiologisch hohe Volumenzufuhr zur Erreichung ausreichender Aktivitäten nötig war. Dies könnte zu einem iatrogenen Lungenödem mit konsekutiver Ablagerung größerer Toxinmengen in der Lunge geführt haben. Ein Beweis hierfür liegt jedoch nicht vor; keines der Tiere starb infolge dieser Behandlung.

Die widersprüchlichen Ergebnisse nach i.p.- und i.v.-Applikation lassen sich weitgehend durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklären. Bei Resorption aus dem Peritonealraum gelangt ein erheblicher Anteil des Toxins über den Pfortaderkreislauf direkt in die Leber, die als erste Clearancestation fungiert und bereits große Mengen des Toxins bei der ersten Passage aufnehmen kann. Bei intravenöser Applikation ist das Kapillarsystem der Lunge die erste Filterstation, wo ein Teil des Toxins, das hier in hoher Konzentration vorliegt, phagozytiert wird. Damit sinkt das Toxinangebot im Leberblut und somit zwangsläufig die Leberspeicherung. Trotzdem nimmt sie noch rund 40 % der Toxinmenge auf, was ihre große Bedeutung im RES-System unterstreicht.

Es wird vermutet, daß noch weitere Faktoren, wie z.B. Mikroembolien für die unerwartet hohe Lungenspeicherung nach i.v.-Applikation verantwortlich waren. Ob dies Wirkungen des Toxins oder Folgen des unphysiologischen Versuchsaufbaus waren, bleibt unklar.

Sowohl nach i.p.- als auch nach i.v.-Applikation wurde weniger als 30 % der Toxinmenge in den untersuchten Organen nachgewiesen. Für den Verbleib des übrigen Anteils ergeben sich prinzipiell folgende Erklärungsmöglichkeiten:

1. Der fehlende Anteil des Toxins wurde von anderen, nicht untersuchten Organstrukturen, wie z.B. Knochenmark, ZNS oder Darm aufgenommen.
2. Das Toxin befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung noch weitgehend im zirkulierenden Blut.
3. Ein größerer Anteil des Toxins war zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits wieder aus dem Organismus ausgeschieden worden.
4. Es erfolgte eine Dejodierung des Toxins mit der Folge, daß das Toxin in den untersuchten Organen gespeichert war ohne jedoch meßbar zu sein. Das Radiojod müßte sich dann zum Teil in der Schilddrüse befunden haben, zum Teil müßte es über die Nieren bereits wieder abgeschieden worden sein.
5. Das Toxin wurde nicht vollständig aus dem Peritonealraum resorbiert.

Der letztgenannte Punkt liefert keine hinreichende Erklärung, da auch bei i.v.-Applikation nur 30 % der Toxinmenge aufgefunden wurden, obwohl die Resorption als limitierender Faktor umgangen wurde. Die exakte intravasale Injektion wurde nur makroskopisch kontrolliert. Damit konnte jedoch hinreichend sicher ausgeschlossen werden, daß nennenswerte Mengen der Toxinsuspension in das perivasale Bindegewebe infiltriert wurden, das heißt 80 bis 100 % der Gesamtaktivität waren ins Gefäßsystem gelangt. Für die übrigen Erklärungsmöglichkeiten liegen weder positive noch negative Beweise vor. Daß der Versuchsaufbau jedoch geeignet ist, um die RES-Funktion zu untersuchen, zeigt die Tatsache, daß die Testsubstanz 51-Cr-RBC 5 Minuten nach Injektion bereits zu 64 % in den beiden Organen Leber und Milz gefunden wurde. Berücksichtigt man dabei noch die gemessene Restaktivität im Blut, so erhöht sich der Anteil der wiederaufgefundenen Aktivität an 51 Cr auf 80 %.

Mit der i.p.-Applikation und der nachfolgenden allmählichen, über einen größeren Zeitraum verteilten Resorption des Toxins werden

die Vorgänge beim Verbrennungstrauma wesentlich besser nachvollzogen als bei i.v.-Applikation. Wir entschieden uns daher für die generelle i.p.-Applikation des Toxins in allen folgenden Versuchen.

4.2.2.2. Speicherung der Testsubstanz in verschiedenen Organen

Vergleicht man die Speicherrate von 51-Cr-RBC der verschiedenen Versuchsgruppen miteinander, so ergibt sich für die Funktion des RES folgendes Bild (siehe Abbildungen 5 bis 8):

Die Leber gesunder Tiere war in der Lage, die im Blut zirkulierenden 51-Cr-RBC in wesentlich kürzerer Zeit als Fremdkörper zu erkennen und zu phagozytieren als die Leber toxinbehandelter Tiere. Die Speicherrate von 51-Cr-RBC in der Leber nahm unter Toxineinwirkung signifikant ab. 1,5 Minuten nach der Injektion hatte die Leber nach Einwirkung von Toxin im Mittel 44 % weniger 51-Cr-RBC aufgenommen als die Leber der Kontrolltiere ($P < 0,05$). Nach 5 Minuten betrug der Unterschied immerhin noch 31 % ($P < 0,025$).

Die Phagozytoseleistung der Milz zeigte in dieser Versuchsreihe im Mittel keine Veränderung durch Toxin. Die Mittelwerte beider Versuchsgruppen waren nahezu identisch. Es schien jedoch eine Tendenz zur positiven Korrelation zwischen Leber- und Milzspeicherrate bei den einzelnen Versuchstieren zu bestehen.

1,5 Minuten nach Injektion der 51-Cr-RBC zeigten die Nieren der toxinbehandelten Tiere einen deutlich höheren Gehalt an 51 Cr wie die Kontrollen ($P < 0,025$). Dieser Unterschied war jedoch bereits nach 5 Minuten statistisch nicht mehr nachweisbar. Die Niere enthält relativ wenig RES-Zellen und stellt daher kein Zielorgan der 51-Cr-RBC dar. Aus diesem Grunde dürfte hier der Anteil der freien, im Blutvolumen der Niere zirkulierenden 51-Cr-RBC am Meßwert besonders hoch sein. Welchen zusätzlichen Anteil die Ausscheidung ungebundenen 51 Cr am Meßwert hat, ist schwer abzuschätzen. Deshalb besitzen diese Werte als Parameter für die RES-Funktion nur geringe Aussagekraft.

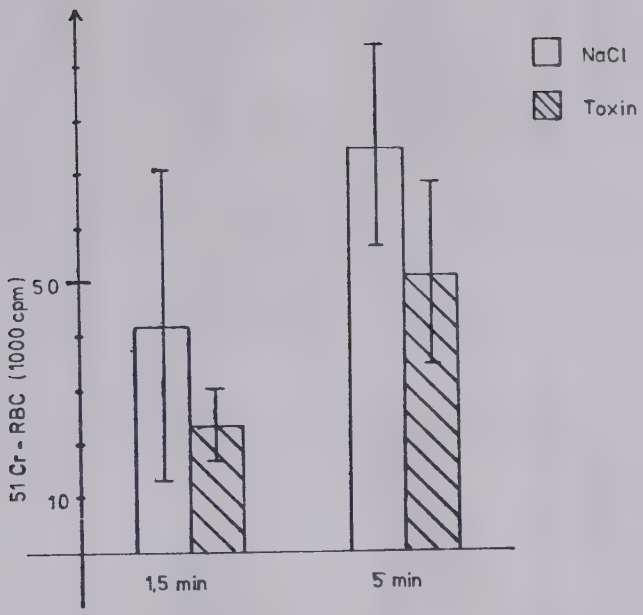

Abb. 5 Speicherrate der 51Cr-RBC in der Leber

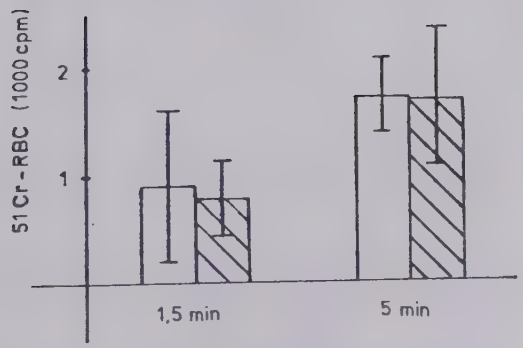

Abb. 6 Speicherrate der 51Cr-RBC in der Milz

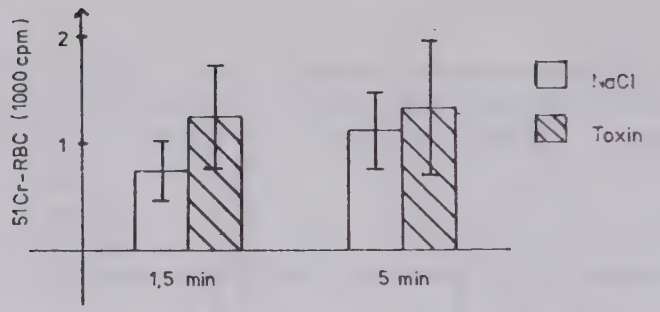

Abb. 7 Speicherrate der 51Cr-RBC in den Nieren

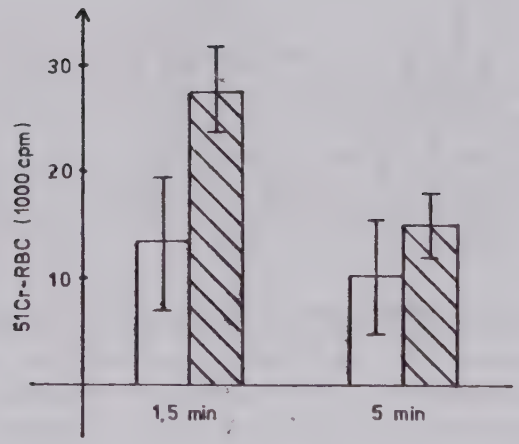

Abb. 8 Speichrrate der 51Cr-RBC in der Lunge

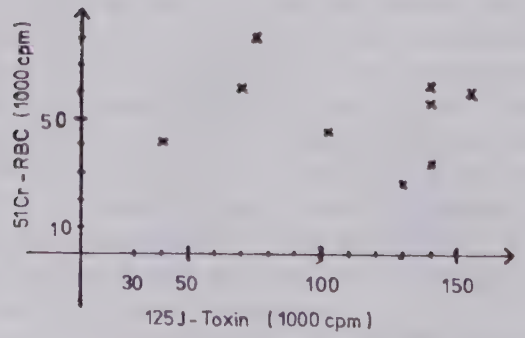

Abb. 9 Korrelation von Toxin- und 51Cr-RBC-Speicherung in der Leber einzelner Tiere

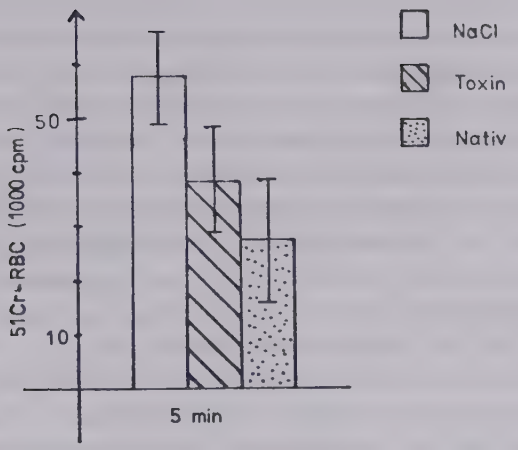

Abb. 10 Speicherrate der 51Cr-RBC in der Leber

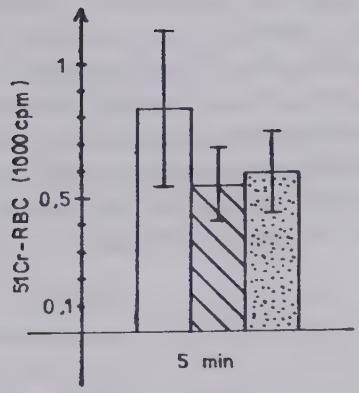

Abb. 11 Speicherrate der 51Cr-RBC in der Milz

Das Verhalten der Lunge bezüglich der Speicherung von 51-Cr-RBC wies zwischen Toxin und Kontrollgruppe erhebliche Unterschiede auf. 1,5 Minuten nach Injektion enthielt die Lunge toxinbehandelter Tiere mehr als doppelt so viel 51-Cr-RBC wie die Lunge der Kontrolltiere ($P < 0,001$). Während sich der Gehalt an 51-Cr-RBC in den Lungen der Kontrolltiere in den folgenden Minuten nur unwesentlich veränderte, fiel er bei der Toxingruppe deutlich ab, blieb aber auf einem höheren Niveau als bei der Kontrollgruppe. Nach 5 Minuten betrug der Konzentrationsunterschied noch 47 % und ist damit signifikant ($P < 0,025$). In Verbindung mit den übrigen Meßwerten kann man davon ausgehen, daß nur ein Teil der Aktivität an RES-Zellen gebundenen 51-Cr-RBC entspricht. Die restliche Aktivität wäre dann Ausdruck der noch frei im Blut zirkulierenden 51-Cr-RBC. Der anfangs stark erhöhte Blutgehalt an 51-Cr-RBC bei toxinbehandelten Tieren wäre somit für die hohe Aktivitätsdifferenz zum Zeitpunkt $t = 1,5$ Minuten verantwortlich. Die Aktivitätsabnahme im Beobachtungszeitraum stellt dann die weiterlaufende Phagozytose im Gesamtorganismus dar. Durch die verminderte Gesamtleistung des RES und die damit verbundene verlängerte Verweildauer im Blut zusammen mit höheren Blutkonzentrationen, steigt das Angebot in der Lunge und damit die Phagozytose in diesem Organ. Mit Zunahme der Beobachtungszeit steigt damit der Anteil der gebundenen bzw. phagozytierten 51-Cr-RBC am Gesamtmeßwert an und wird zum determinierenden Faktor. Auch Saba fand bei RES-Blockade parallel zur Abnahme der Leberspeicherung eine Zunahme der Lungenspeicherung (72). Erscheinen die gemessenen Speicherwerte der Lunge anfangs auch verwirrend, so stellen sie bei näherer Betrachtung doch ein indirektes Maß für die RES-Funktion des Gesamtorganismus dar.

4.2.2.3. Korrelation zwischen Toxinmenge und Ausmaß der RES-Depression

Als Beurteilungsgrundlage dienten die Messungen des Gehaltes an Toxin und 51-Cr-RBC in den Lebern der selben Versuchstiere. Eine Korrelation dieser beiden Parameter konnte mit unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9), das heißt, die Lebern, die die größte Toxinmenge enthielten, hatten nicht gleich-

zeitig auch die niedrigste Rate an 51-Cr-RBC-Speicherung. Unberücksichtigt bleibt dabei das Gewicht der einzelnen Lebern sowie deren möglicherweise unterschiedliche Phagozytosekapazität vor Einwirkung des Toxins, Faktoren, die die Phagozytose bekanntlich beeinflussen können (2,13). Nicht verwechselt werden darf diese Feststellung mit dem Ergebnis unserer Vorversuche, die zeigten, daß die RES-Depression im Gesamtkollektiv quantitativ und zeitlich von der Dosis des applizierten Toxins abhängt.

4.2.3. Versuchsreihe II mit unmarkiertem Toxin

4.2.3.1. Organspeicherung der Testsubstanz

Diese Meßwerte entsprechen vom Versuchsaufbau denen der vorhergehenden Versuchsreihe.

Auch in dieser Versuchsreihe sank die Phagozytoseleistung der Leber nach Toxineinwirkung ab. In den ersten 5 Minuten nach Injektion der 51-Cr-RBC nahm die Leber toxinbehandelter Tiere im Mittel nur 67 % des Normalwertes auf ($P < 0{,}001$). Dieser Befund entspricht exakt dem Ergebnis aus Versuchsreihe I. Mit Nativ, dessen Wirkung hier zusätzlich untersucht wurde, sank die Speicherrate noch stärker ab. Sie erreichte nur 48 % des Normalwertes ($P < 0{,}001$). Das Nativ besitzt somit eine stärkere depressorische Wirkung auf das RES als das Toxin (siehe Abbildung 10).

Auch die Phagozytoseleistung der Milz sank in dieser Versuchsreihe unter Toxineinwirkung ab. Sie ging im Durchschnitt auf 65 % des Normalwertes zurück ($P < 0{,}005$) nach Nativgabe reduzierte sie sich auf 71 % des Normalwertes ($P < 0{,}025$). Toxin und Nativ bewirkten also bei der Milz eine nahezu gleichstarke Phagozytoseminderung (siehe Abbildung 11). Diese Ergebnisse stehen in grassem Widerspruch zur vorhergehenden Versuchsreihe, den dort zeigte sich keine signifikante Abnahme der Milzspeicherung nach Toxingabe. Die in Versuchsreihe I etwas kleinere Anzahl der Versuchstiere kann kaum dafür verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang fiel auf, daß die Streuung der Meßwerte in Versuchsreihe I im allgemeinen

größer war als bei dieser Versuchsreihe. Eine plausible Erklärung für diese divergierenden Befunde konnte jedoch nicht gefunden werden.

Eine Korrelation zwischen der Speicherung in der Leber und der in der Milz bei den einzelnen Versuchstieren konnte nicht nachgewiesen werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da damit ausgeschlossen werden kann, daß die großen Streuungen der einzelnen Meßwerte lediglich Ausdruck einer nicht genügend standardisierten Versuchsanordnung sind, wie z.B. Abweichungen in der Dosis der applizierten 51-Cr-RBC oder ungenaues Einhalten der Untersuchungszeitpunkte, etc. Solche Abweichungen müßten sich auf die Speicherraten von Leber und Milz gleichsinnig auswirken.

4.2.3.2. Entfernung der Testsubstanz aus dem Blut

4.2.3.2.1. Clearance-Werte

Die mittleren Clearance-Werte der Kontrollgruppe nach 0,5 Minuten, 1,5 Minuten und 4,0 Minuten betrugen 40 %, 60 % und 80 %. Dagegen betrug die mittlere Clearance nach Toxingabe zu den selben Zeitintervallen 15 %, 25 % und 70 % sowie nach Gabe von Nativ nur 0 %, 10 % und 35 % (siehe Tabelle I). Die Unterschiede der jeweiligen Mittelwerte beider Versuchsgruppen zur Kontrollgruppe waren statistisch signifikant ($P \leq 0{,}005$).

	30 sec	90 sec	240 sec	Leberspeicherung 300 sec
NaCl	40 %	60 %	80 %	62 %
Toxin	15 %	25 %	70 %	42 %
Nativ	0 %	10 %	35 %	30 %

Tabelle I 51Cr-RBC-Clearance

4.2.3.2.2. Charakteristica der Clearance-Kurven

Während bei den Kontrolltieren die Clearance-Kurven einen exponentiellen Verlauf aufwiesen, ließ sich bei den beiden Versuchsgruppen nach Toxin- bzw. Nativgabe mit hinreichender Wahrscheinlichkeit kein exponentieller Kurvenverlauf ermitteln.

Unter Berücksichtigung eines hypothetischen Meßwertes - 1160 cmp/ 20 Mikroliter - zum Zeitpunkt der Injektion (t = 0 min.), errechnet aus dem Blutvolumen der Maus (37) und der applizierten Gesamtdosis, fanden wir bei der Kontrollgruppe den bereits andernorts beschriebenen (70) zweigeteilten exponentiellen Kurvenverlauf mit einem steilen Anfangsteil und einem flacheren zweiten Teil.

Die Clearance-Kurve der Nativgruppe ließ sich unter Bildung der Mittelwerte über den gesamten Versuchszeitraum als Gerade darstellen. Lediglich der hypothetische Nullwert lag nicht voll auf dieser Geraden. Bei Extrapolierung der ermittelten Geraden gegen t = 0 ergab sich ein Nullwert von ca. 1230 cpm/ 20 Mikroliter. Da in dieser Versuchsgruppe auch diverse Einzelmeßwerte über dem aufgrund des normalen Blutvolumens der Maus errechneten Nullwert lagen, könnte vermutet werden, daß die Gabe von Nativ über einen bislang unbekannten Mechanismus zu einer Hämokonzentration geführt hatte.

Bei der Toxingruppe war der gemessene Blutgehalt an 51-Cr-RBC zum Zeitpunkt t = 1,5 Minuten in 30 % der Einzelfälle größer als der 0,5 Minutenwert, die Konzentration der 51-Cr-RBC nahm also in diesem Teil der Clearance-Kurve zu statt ab. Daraus schlossen wir, daß in diesen Fällen die Anflutung der 51-Cr-RBC von der Injektionsstelle und deren Verteilung im Blutvolumen in diesem Zeitraum noch andauerten und die Phagozytosevorgänge überlagerten. Verlangsamte Verteilungsvorgänge oder verminderte Phagozytose bzw. - noch wahrscheinlicher - beide Faktoren gemeinsam, dürften Ursache dieses Phänomens sein.

Aufgrund der starken Divergenz der einzelnen Clearance-Kurven dieser Gruppe ließ sich kein eindeutiger Kurvenverlauf ermitteln. Unter Zugrundelegung von Mittelwerten und Standardabweichungen haben wir 2 Clearance-Kurven konstruiert. Eine dem Verlauf der Kontroll-

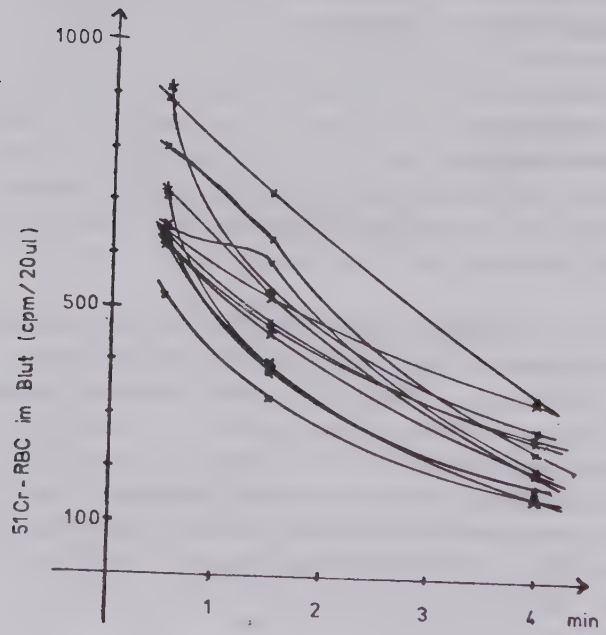

Abb. 12 Blutclearance der 51Cr-RBC nach Applikation von NaCl
Darstellung der Einzelkurven

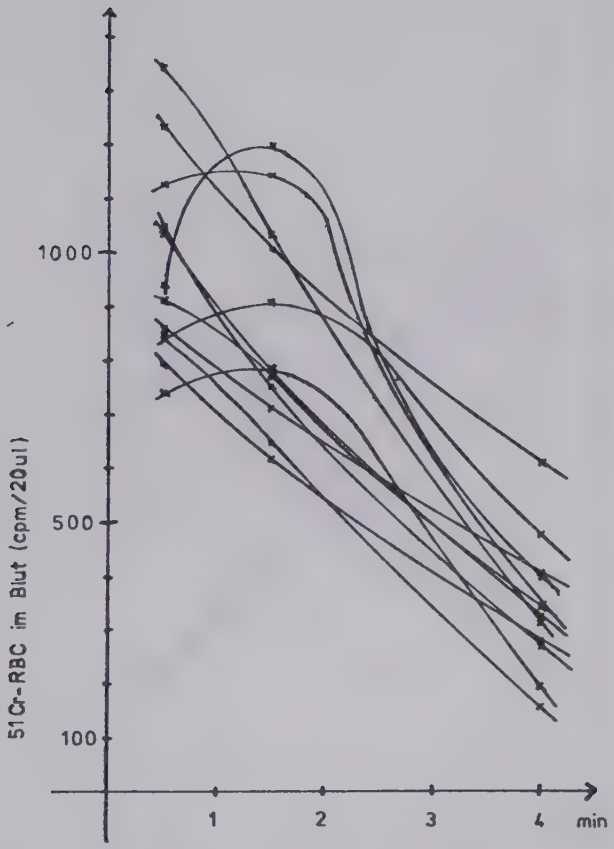

Abb. 13 Blutclearance der 51Cr-RBC nach Applikation von 5mg Toxin
Darstellung der Einzelkurven

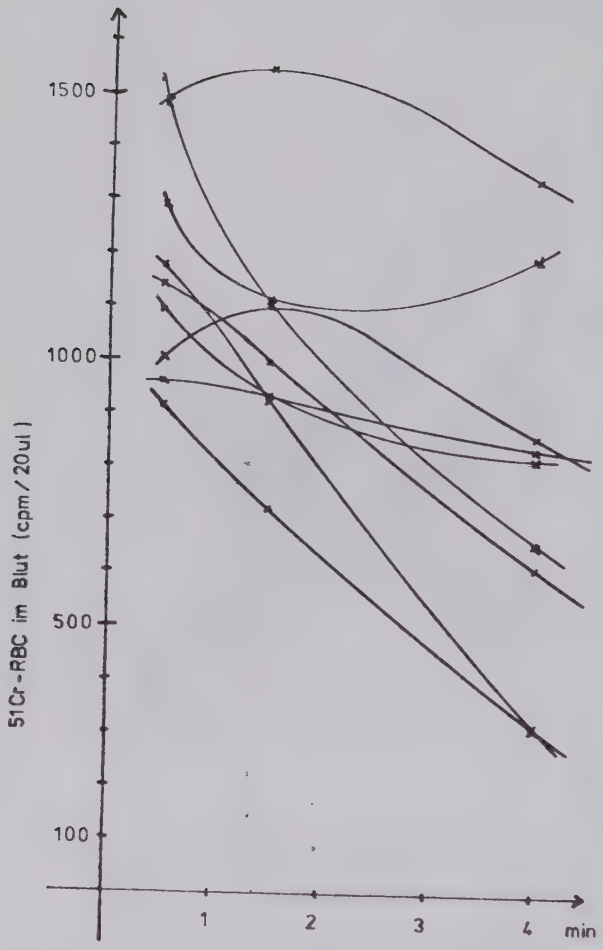

Abb. 14 Blutclearance der 51Cr-RBC nach Applikation von 5mg Nativ
Darstellung der Einzelkurven

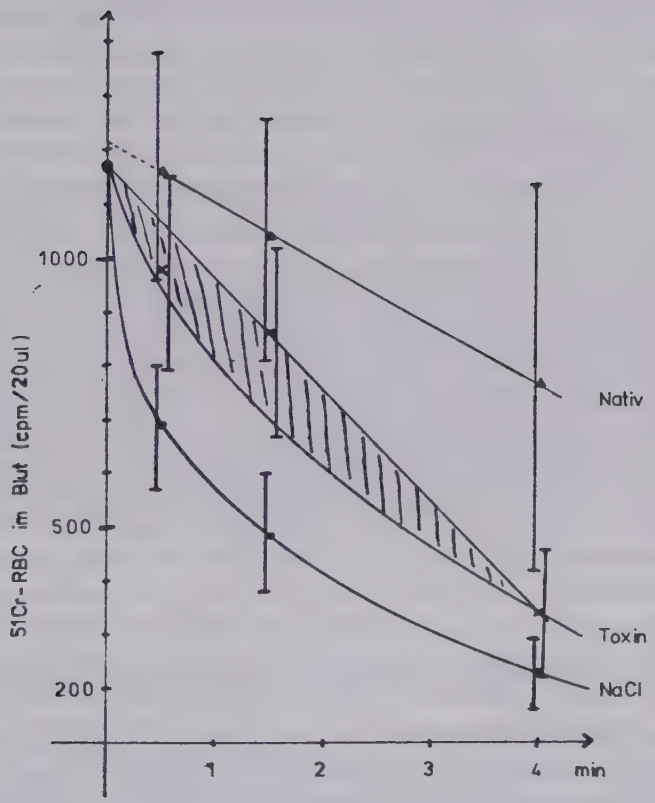

Abb. 15 Clearancekurven aus den Mittelwerten der drei Versuchsgruppen unter Berücksichtigung der Standardabweichungen

gruppe entsprechende Kurve mit exponentiellem Charakter und eine den Ergebnissen der Nativgruppe entsprechende in Form einer Geraden. Innerhalb der von diesen beiden Kurven gebildeten Fläche dürfte die tatsächliche Clearance-Kurve verlaufen (siehe Abbidlung 15).

4.2.3.2.3. Phagozytoseindex

Nach der in Kapital 2.3.2. angegebenen Formel wurde für alle Versuchsgruppen ein Phagozytoseindex errechnet. Für den steilen Anteil der Clearance-Kurve der Kontrollgruppe ergab sich ein Phagozytoseindex von K1 = 1,04, für den flacheren Anteil der Kurve von K2 = 0,32. Der Phagozytoseindex der Nativgruppe betrug K3 = 0,10. Für die Toxingruppe ergab sich bei Zugrundelegung eines exponentiellen Kurvenverlaufs ein Index von maximal K4 = 0,45 für den steilen Anfangsteil und K5 = 0,28 für den flacheren Endteil, bzw. ein Phagozytoseindex von K6 = 0,30 bei Zugrundelegung eines linearen Kurvenverlaufes. Der gesuchte Index dürfte also im Bereich 0,45 > K-Toxin > 0,28 liegen.

4.2.3.2.4. Verläßlichkeit und Aussagekraft der einzelnen Parameter

Vergleicht man die experimentell gewonnenen Clearance-Kurven der Kontrollgruppe (Abbildung 12) mit denen der Toxingruppe (Abbildung 13) bzw. der Nativgruppe (Abbildung 14) so fällt auf, daß einer relativ homogenen Kontrollgruppe stark inhomogene Versuchsgruppen gegenüberstehen. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, daß bei Einwirkung einer pharmakologisch wirksamen Substanz eine Reihe von Faktoren Bedeutung erlangen, die bei bloßer Funktionsprüfung des RES keine Rolle spielen; dazu gehören Schwankungen der Resorptionsquote sowie der Resorptionsgeschwindigkeit des Stoffes aus dem Peritoneum, Metabolisierungs- und Eliminationsraten, eventuelle Bindungskapazitäten für diesen Stoff im Blut und in den Zellen, unterschiedliche Aktivitäten der mit diesem Stoff in Wechselwirkung tretenden Enzyme usw. Wie bereits in der vorhergehenden Versuchsreihe mit markiertem Toxin fanden wir auch hier wieder eine große Streuungsbreite der

Meßwerte als Ausdruck der individuellen Reaktion des jeweiligen Organismus auf die zu untersuchende Substanz. Dies findet seinen mathematisch-statistischen Ausdruck in der größeren Streuung der Meßwerte der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Negative Einwirkungen durch die Versuchsanordnung können ausgeschlossen werden, da die relativ homogenen Werte der Kontrollgruppe deutlich zeigen, daß die hier verwendete Versuchsanordnung zur Messung der RES-Funktion geeignet ist. Auch andere Untersuchungen fanden nach Toxingabe starke Schwankungen der experimentell ermittelten Werte (88).

Durch die Bestimmung der gespeicherten Radioaktivität in der Leber konnte deren Phagozytoseleistung direkt gemessen werden. Diese Meßwerte haben daher zweifelsohne die höchste Aussagekraft für die Funktion der Kupffer'schen Sternzellen. Das gleiche gilt für die Bestimmung der Phagozytoseleistung der RES-Zellen in der Milz. Die Addition von Leber- und Milzspeicherung plus Restgehalt des Blutes an 51-Cr-RBC ergibt die insgesamt aufgefundene Menge der Testsubstanz. Der übrige, in unseren Versuchen nicht aufgefundene Anteil verläßt die Blutbahn ohne von Leber oder Milz aufgenommen zu werden. Dieser Anteil ist bei den einzelnen Versuchsgruppen unterschiedlich und schwankt zwischen 5 % und 30 %. Die Bestimmung der Clearance-Rate durch Messung der Blutkonzentration gibt daher Auskunft über die Gesamtfunktion des RES als ubiquitär im Organismus verstreute funktionelle Einheit, eine Aussage, die die alleinige Messung der Leber- und Milzspeicherung nicht liefert. Darüberhinaus ermöglicht diese Methode einen besseren Einblick in die Funktionsabläufe, da durch sie mehrere Messungen in zeitlicher Folge an demselben Tier möglich sind. Dies erscheint uns - gerade bei den starken Streuungen von Individuum zu Individuum - von besonderem Wert zu sein. Beide Untersuchungsmethoden ergänzen sich daher zu einem detaillierteren Gesamtbild.

Unspezifische Absorptionsvorgänge in der Blutbahn, wie z.B. durch intravasale Gerinnungsvorgänge (Einschluß der 51-Cr-RBC in Thromben oder Veränderungen im Blutvolumen) verfälschen die Clearance-Werte. Die Messung der Organspeicherung wird hiervon, wie schon ausgeführt, weniger betroffen, ist also weniger störanfällig. Allerdings kann bei

Messung des Gehaltes an 51-Cr-RBC in den einzelnen Organen nicht unterschieden werden zwischen phagozytierten bzw. fest absorbierten und frei im Blutstrom der Organe sich befindenden 51-Cr-RBC. Dies führt vor allem bei Organen, die nur geringe Mengen der Testsubstanz speichern, zu Ungenauigkeiten.

5. DISKUSSION

5.1. Markierungsmethode und Toxinverteilungsmuster

Wir vermuteten, daß das vorliegende Verbrennungstoxin nach i.p.-Injektion resorbiert wird und in die Blutbahn gelangt. Als körperfremdes Makromolekül müßte es entsprechend der natürlichen Funktion des RES durch dieses abgefangen und phagozytiert werden. Dieser Weg des Toxins kann nur mit Hilfe einer Markierung verfolgt werden. Die einzige bisher in der Literatur beschriebene Markierungsmethode verwendet 14-Kohlenstoff als Markierungsisotop (82). Dabei wird zu Markierungszwecken der Proteinkern des Toxinmoleküls von seinem Lipidmantel getrennt und zur Relipidierung 14-C-markiertes Cholesterin eingesetzt. Das Radioisotop ist bei diesem Vorgehen in dem biologisch inerten Teil (25) des Moleküls eingebaut und es bleibt unklar, ob nach der Relipidierung wirklich der gesamte Anteil des 14-C proteingebunden vorliegt, oder ob die Relipidierung unvollständig bleibt und damit ein Teil des 14-C gar nicht an das Toxinmolekül gebunden wird.

Mit der von uns entwickelten Markierungsmethode wird erstmals der biologisch aktive Anteil des Moleküls direkt markiert und durch das Dialyseverfahren der ungebundene Anteil des Radioisotops sicher abgetrennt. Die Verwendung des Gammastrahlers ^{125}Jod an Stelle eines betastrahlenden Isotopes bringt durch die einfachere Meßmethotik weitere klare Vorteile.

Vergleiche zwischem dem von uns ermittelten Organverteilungsmuster des Toxins und dem von Schoenenberger veröffentlichten Ganzkörperradiographien von Mäusen nach Applikation von 14-C-markiertem Toxin (82) zeigen übereinstimmende Ergebnisse. Bei beiden Versuchsanordnungen wurde eine Anreicherung des Toxins in den verschiedenen Organen mit deutlicher Betonung der Leber gefunden. Die Aufnahme größerer Mengen des Verbrennungstoxins durch die Kupffer'schen Sternzellen der Leber kann damit als gesichert gelten.

Auffallend ist eine in beiden Versuchen relativ hohe Strahlungsintensität im Bereich des Thymus. Aufgrund dieses Befundes wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit das Toxin hier zu Veränderungen im Immunsystem führt.

Auch der Toxingehalt in der Niere sollte zu weiteren Untersuchungen Anlaß geben. Bis jetzt ist nicht geklärt, ob die Aktivitäten in der Niere nur Ausdruck von Ausscheiduungsvorgängen sind, oder ob das Toxin an Organstrukturen gebunden wird und eventuell hier für die Verbrennungskrankheit bedeutsame morphologische bzw. funktionelle Veränderungen hervorruft. Es sei hier nur auf einen möglichen Zusammenhang mit Serum-Harnstoff- und Kreatininanstieg sowie einem Nierenversagen nach Verbrennungen hingewiesen.

Die in dem Ganzkörperradiographien erkennbare unterschiedlich starke Toxineinlagerung in fast allen Organen macht deutlich, warum wir in den selektiv untersuchten Organen Leber, Milz, Lunge, Nieren und Thymus nur einen Teil der injizierten Gesamtdosis nachweisen konnten. Die im Bereich des Intestinums außerhalb der Darmlumina erkennbare Strahlungsaktivität kann sowohl Ausdruck einer Speicherung in der Darmwand und im Mesenterium als auch Ausdruck einer unvollständigen Resorption aus dem Peritonealraum sein. Das könnte eine Ursache für die starke Schwankungsbreite im Toxingehalt der RES-Organe der einzelnen Versuchstiere sein.

Der relativ geringe Toxingehalt der Lunge in den Ganzkörperradiographien entspricht unseren Ergebnissen nach i.p-Injektion des Verbrennungstoxins. Die abweichenden Befunde nach i.v.-Injektion können damit endgültig als Folge der unphysiologischen Versuchsbedingungen angesehen werden.

Die native Vorstufe des Toxins wurde nicht markiert. Deshalb konnte für diese Substanz kein Verteilungsmuster ermittelt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit im Molekülaufbau sowie der von uns nachgewiesenen gleichsinnigen Wirkung dieser Substanz nehmen wir an, daß für das Nativ eine entsprechende Organverteilung gilt.

5.2. Wirkung des Toxins

Bis auf wenige abweichende Befunde (67) herrscht heute weitgehend Einigkeit darüber, daß es nach Verbrennungen zu einer vorübergehenden Minderfunktion des RES kommt (65). Zeitpunkt und Dauer dieser RES-Depression werden jedoch unterschiedlich angegeben. Die RES-Depression tritt innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach dem Verbrennungstrauma auf. Während mehrere Untersucher eine Rückkehr zu Normalwerten innerhalb 1 bis 3 Tagen beobachteten (22,77), berichtet Schildt (75) von einer verbrennungsinduzierten RES-Depression, die 8 Tage lang nachweisbar war. Nach Erholung des RES kommt es, wie übereinstimmend beobachtet wird, zu einem vorübergehenden Zustand der Hyperphagozytose.

Es ist experimentell gesichert, daß das zu untersuchende Verbrennungstoxin nach i.p.-Applikation in nennenswertem Umfang das RES erreicht. Dort bewirkt es eine vorübergehende RES-Depression, die 8 Stunden nach Applikation besonders deutlich nachweisbar ist. Diese Abnahme der Phagozytoseleistung des RES ist zum untersuchten Zeitpunkt hochsignifikant. Aufgrund unserer Vorversuche kann darüberhinaus angenommen werden, daß auch die toxininduzierte RES-Depression nur wenige Tage anhält und anschließend in eine passagere Hyperphagozytose übergeht.

Die Minderfunktion des RES als Gesamteinheit konnte mit Hilfe der Clearance-Methode durch wiederholte Bestimmungen der Konzentration einer Testsubstanz im Blut nachgewiesen werden. Untersucht man jedoch die RES-Organe einzeln, so ergibt sich ein differenzierteres Bild.

Die verminderte Speicherrate der Leber als wichtigstes RES-Organ war in allen Versuchsreihen überzeugend nachzuweisen. Demgegenüber zeigte die Milz entweder keine oder nur eine wesentlich geringfügigere Funktionseinschränkung nach Toxinapplikation. Entsprechende Befunde konnten auch bei künstlicher RES-Blockade durch kolloidale Substanzen und bei RES-Blockade durch traumatischen Schock erhoben werden (42,52, 71, 72). Auch hier steht einer deutlich verminderten Leberspeicherung eine unveränderte Milzspeicherung gegenüber. Für dieses abweichende

Verhalten der Milz bei RES-Depression wurde bis heute keine Erklärung gefunden. Es scheint jedoch so zu sein, daß die einzelnen Makrophagen auch im Normalzustand unterschiedlich reagieren (35). Bei Untersuchungen mit mehreren Kolloiden am selben Individuum konnte gezeigt werden, daß die einzelnen Makrophagen weitgehend selektiv jeweils nur eines der applizierten Kolloide aufgenommen hatten (61, 62, 79, 96). Bei Verwendung von kolloidalem Eisen und Karminfarbstoff als Testsubstanzen wurde das Eisen hauptsächlich in den Makrophagen der Milz gefunden, während die Makrophagen der Leber den Farbstoff enthielten (51). Dieser Effekt kann nur über eine unterschiedliche selektive Funktion der einzelnen Makrophagen erklärt werden.

Die Lunge zeigt nochmals ein anderes Verhalten als Leber und Milz. In den oben erwähnten Untersuchungen (42, 71, 72) wurde in der Lunge im Stadium der RES-Depression eine verstärkte Aufnahme der Testsubstanz beobachtet. Auch unsere Lungenbefunde weisen in die gleiche Richtung. Die vermehrte Lungenspeicherung wird von Warr (97) jedoch lediglich als Sekundäreffekt der verminderten Leberleistung und dem damit gestiegenden Substratangebot gewertet. Da bei Applikation steigender Dosen einer Testsubstanz bei gesunden Tieren der prozentuale Anteil der Lungenspeicherung auch zunimmt (70), erscheint diese These stichhaltig. Schildt (74) berichtet sogar, daß die in der Lunge aufgefundenen Partikel auswaschbar sind, und somit nicht phagozytiert, sondern lediglich im Kapillarbett absorbiert worden seien.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen also, daß nach Applikation des untersuchten Verbrennungstoxins am RES Veränderungen gefunden werden, die denen beim Verbrennungstrauma entsprechen. Trotzdem müssen erhebliche Zweifel geäußert werden, ob die RES-Depression beim Verbrennungstrauma wirklich durch diese Substanz hervorgerufen wird. Es ist zwar anzunehmen, daß Verbrennungstoxine unter Wärmeeinwirkung im Verbrennungsgebiet sofort entstehen, jedoch dürften diese nach den heutigen Erkenntnissen erst im Verlauf der Resorptionsphase, also ab dem 2. bis 3. Tag nach dem Verbrennungstrauma in größerem Umfang resorbiert werden und damit das RES erreichen. Daher ist es unwahrscheinlich, daß Verbrennungstoxine zu diesem frühen Zeitpunkt der RES-Depression - nämlich unmittelbar nach dem Verbrennungstrauma - bereits ihre volle Wirkung im Organismus entfalten.

Andererseits ist auch kaum verständlich, daß zum Zeitpunkt der vermuteten stärksten Resorption derartiger Verbrennungstoxine das RES eine Überfunktion aufweisen soll. Daß die von uns beobachtete toxininduzierte RES-Depression während der Resorptionsphase nicht nachweisbar wird, kann im Hinblick auf die Ursache unterschiedlich interpretiert werden. Zum einen wäre es möglich, daß die toxininduzierte RES-Depression überdeckt wird durch den im Anschluß an die beim Verbrennungstrauma beobachtete frühe RES-Depression auftretenden Aktivierungszustand des RES, wobei diese frühe RES-Depression dann eine Folge des Verbrennungsschocks und toxinunabhängig wäre. Zum anderen wäre es möglich, daß die beim Verbrennungstrauma entstehenden Verbrennungstoxine mit dem von uns untersuchten Toxin nicht identisch sind.

Die in unseren Versuchen gemessene Wirkung des Nativ stellt zusätzlich die Spezifität des untersuchten Verbrennungstoxins hinsichtlich der beobachten RES-Depression stark in Frage. Nach den bisherigen Veröffentlichungen zur Wirkung dieses Toxins dürfte das Nativ keine oder nur bedeutend geringere Wirkung zeigen als das Toxin. Nach unseren Versuchen besitzt jedoch das Nativ - bezogen auf das Gewicht - eine deutlich stärkere depressorische Potenz gegenüber dem RES als das Verbrennungstoxin. Auf molekularer Ebene entspricht die applizierte Nativdosis zwar der dreifachen Toxindosis, so daß dem Toxin eventuell doch eine graduell stärkere Wirkung zugesprochen werden könnte, die Behauptung einer Spezifität dieser Wirkung kann jedoch nicht aufrecht erhalten werden. Die toxinduzierte RES-Depression erscheint eher vergleichbar mit der bekannten RES-Blockade, die nach Applikation verschiedener kolloidaler Substanzen beobachtet wird. Der gleichartige zeitliche Ablauf und die schnelle Erholung des RES in beiden Fällen weisen auf ähnliche, nicht für die Verbrennungskrankheit spezifische Vorgänge hin.

5.3. Wirkungsmechanismen bei RES-Depression

Es wurde schon anderenorts diskutiert, ob die Wirkung dieses Verbrennungstoxins nicht nur auf einer Verunreinigung mit Endotoxin

beruhen könnte (68). Die Argumente gegen diese Hypothese fasst Kremer (47) wie folgt zusammen: Auch Verbrennungstoxin, das aus der Haut keimfrei aufgezogener Versuchstiere gewonnen wurde, zeigte in seinen Untersuchungen toxische Wirkungen. Diese Wirkungen, unter denen Mitochondrienveränderungen der Leberzellen eine zentrale Stellung einnehmen, müßten als Endotoxinfolge innerhalb von 12 Stunden auftreten und nicht, wie von Kremer beobachtet, erst nach einem Intervall von 5 Tagen. Auch müßte als Endotoxinfolge die native Substanz dieselben Wirkungen zeigen, da dessen Isolationsverfahren prinzipiell identisch ist.

Diese Argumente gegen eine Endotoxinwirkung treffen für unsere Versuche nicht zu. Toxin und Nativ wurden von nicht keimfrei aufgezogenen Versuchstieren gewonnen. (Auch schließt die Verwendung keimfreier Tiere eine Kontamination im Verlauf des langwierigen Isolationsverfahren nicht aus). Nativ zeigte in unseren Versuchen eine gleichsinnige Wirkung wie das Toxin. Die vergleichsweise stärkere Wirkung des Nativ ließe sich unter dieser Hypothese mit einer Keimreduktion durch eine unvollständige Hitzesterilisation beim Verbrennungsvorgang erklären. Außerdem tritt bei unseren Versuchen die untersuchte Wirkung innerhalb der geforderten 12 Stunden auf. Tatsächlich könnte also die von uns beobachtete Wirkung des Toxins auf einer Endotoxinkontamination beruhen, jedoch liefern unsere Ergebnisse dafür keinen direkten Beweis.

Unterstellt man dem Toxin eine substrateigene Wirkung, so könnten die möglichen Angriffspunkte dieser Substanz die selben sein, wie bei anderen Formen der RES-Blockade.

Eine Blockade des RES durch Saturierung der RES-Zellen, wie sie früher angenommen wurde (14), wird nach neueren Ergebnissen abgelehnt (39,56).

Grundvoraussetzung für die Klärfunktion der Leber ist eine ausreichende Durchblutung dieses Organs (11,20). Nur wenn die zu phagozytierenden Partikel in ausreichendem Maße mit dem Blut in die Leber geschwemmt werden, können sie von deren Makrophagen aufgenommen werden. Die Leber besitzt jedoch eine enorme Reserve

an Phagozytosekapazität. Erst ein Absinken der portalen Durchblutungsrate um über 57 % bewirkt im Tierversuch am Model der Ratte eine Änderung der Carbon-Clearance (59). Dieses Phänomen wird mit einer kompensatorischen Durchblutung normalerweise geschlossener Sinusoide erklärt. Umgekehrt untersuchte Norman (60) auch die Leberdurchblutung bei Ratten während einer mit denaturiertem Albumin künstlich erzeugten RES-Depression. Laufende Messungen vor und während der RES-Depression zeigten keine Veränderungen der Durchblutungsrate. Die künstlich verminderte RES-Funktion,die mit der Carbon-Clearancemethode verifiziert wurde, beruhte also nicht auf einer verminderten Leberdurchblutung. Banaszak (9) berichtet von verminderter Durchblutung im Splanchnicusgebiet nach Injektion eines Testkolloides, die jedoch kürzer anhielt als die begleitende RES-Depression, und er kommt daher auch zu dem Schluß, daß die Durchblutung nicht der entscheidende Faktor der RES-Depression sei. Auch eine Untersuchung der Leberdurchblutung nach Verbrennungen erbrachte entsprechende Befunde (76). Es wurde zwar eine leichte Verminderung der portalen Durchblutungsrate in der frühen Verbrennungsphase gefunden, jedoch erklärt diese die RES-Depression nicht hinreichend.

Da die Phagozytose entsprechender Partikel durch die RES-Zellen energieabhängig ist (70), ist auch eine ausreichende Energieversorgung der Makrophagen unbedingte Voraussetzung für deren Funktion. Arturson (3) fand einen starken Glykogenabfall der Leberzellen am ersten Tag nach Verbrennungen. Derartige Veränderungen wurden bisher nach Toxinapplikation nicht beschrieben. Auch Kremer (47) fand nach Standardverbrennungen am ersten bis dritten Tag posttraumatisch eine Vakuolisierung der Hepatozyten als Ausdruck einer unspezifischen schockbedingten energetischen Insuffizienz. Nach Toxingabe wurden von ihm in diesem Zeitraum keine derartigen Veränderungen festgestellt. Die von ihm beobachteten Mitochondrienveränderungen mit konsekutiven Energiestoffwechselstörungen fanden sich erst ab dem fünften Tag nach Injektion des Toxins, stehen also trotz identischem Versuchsaufbaus in keinerlei zeitlichem Zusammenhang mit der von uns beobachteten RES-Depression, so daß diese Veränderungen nicht als Ursache angesehen werden können.

Es scheint ein enger Zusammenhang zu bestehen zwischen der Opsoninkonzentration im Blut und der Phagozytoseleistung des RES. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß parallel zu verschiedenen Formen der RES-Blockade der Opsoningehalt des Blutes abnimmt (23, 39, 69, 71, 72, 86). Jeunet (40) gelang die Aufhebung einer durch Kolloidinjektionen künstlich an der isolierten Leber erzeugten RES-Blockade durch Austausch des "verbrauchten" Serums im Leberperfusat. Eine Abnahme der Opsonine wurde auch bei Patienten mit schweren Verbrennungen beobachtet (15). Den ursächlichen Zusammenhang zwischen diesen Serumveränderungen und der RES-Depression bei Verbrennungen konnte Schildt (77) bei in vitro Versuchen zeigen. Bei Inkubation von Leberdünnschnitten verbrannter und nicht verbrannter Tiere in 51-Cr-RBC-haltigem Testmedium zeigte sich nur dann eine RES-Depression, wenn Sera verbrannter Tiere verwendet wurden. Die Phagozytoseleistung war jedoch unabhängig davon, ob die Leberschnitte von verbrannten oder gesunden Tieren stammten. Auch die Leberschnitte verbrannter Tiere phagozytierten die Testerythrozyten unter Einwirkung von Sera gesunder Tiere ohne Einschränkung. Die Ursache der RES-Depression muß daher in einer Veränderung des Serums liegen. Eine Schädigung der Kupffer'schen Sternzellen erscheint aufgrund dieser Befunde als Ursache ausgeschlossen. Leider scheiterte die Wiederholung dieses sehr eindrucksvollen Versuches unter Verwendung des Verbrennungstoxins an technischen Schwierigkeiten in unserem Labor. Auch waren Beobachtungen des Opsoningehaltes im Blut der Versuchstiere während der toxininduzierten RES-Blockade nicht möglich, da keine größeren Versuchstiere zur Verfügung standen, die für solche Untersuchungen - der gehäuften Blutentnahmen wegen - notwendig sind (23).

Der häufig im Anschluß an eine RES-Blockade beobachtete Hyperphagozytosezustand des RES wird jedoch nicht von einem erhöhten Opsoninangebot gegleitet (69, 97), dies im Gegensatz zu den gleichsinnigen Veränderungen von Opsoninangebot und Phagozytoseleistung bei RES-Depression. Hyper- und Hypophagozytose sind daher zwei Zustände, die unterschiedlichen Regelmechanismen unterliegen.

Als Opsonine können verschiedene Eiweißmoleküle dienen. Bekannt für ihre Opsoninwirkung sind unter anderem die Immunglobuline und das Komplement. Für diese Substanzen wurden inzwischen auch spezifische Rezeptoren an der Oberfläche der Makrophagen identifiziert: Die Fc-Rezeptoren und die C3-Rezeptoren (57, 29). Es liegen Befunde vor, daß die Immunglobuline IgG und IgM (54, 55, 102) sowie das Komplement (28, 87) bei Verbrennungspatienten vor allem in der Frühphase vermindert sind.

Versuche mit künstlicher RES-Blockade durch Kolloidinjektionen machen die Existenz eines multiplen Opsoninsystems wahrscheinlich, da bei diesen Versuchen nur die Phagozytose einzelner Kolloide gehemmt wird, während gleichzeitig chemisch differierende Kolloide unbehindert phagozytiert werden (56). Diese selektive Blockade für bestimmte Substanzen könnte durch Verbrauch einer einzelnen Opsoninfraktion ausgelöst werden. Wenn trotzdem alle Untersuchungen in der Frühphase der Verbrennungskrankheit eine RES-Depression finden - unabhängig von der verwendeten Testsubstanz - muß diese RES-Depression entweder durch einen auf alle Opsoninfraktionen wirkenden Hemmfaktor ausgelöst werden, oder das RES wird durch eine Vielzahl chemisch inhomogener Substanzen überflutet, bei deren Phagozytose ein allgemeiner Opsoninmangel entsteht. Die letztgenannte Überlegung würde bedeuten, daß ein einzelnes chemisch definiertes Verbrennungstoxin, wie das von uns untersuchte, nicht alleiniger Auslöser dieser RES-Depression sein kann. Experimentelle Untersuchungen auf der Suche nach einem Opsonininhibitor erbrachten widersprüchliche Ergebnisse (15, 47).

Auch die Corticosteroide beeinflussen die RES-Funktion. Die RES-Depression nach mechanischem und thermischem Trauma wird begleitet von einer Konzentrationserhöhung der Plasmacorticosteroide. Entsprechend vermindert die experimentelle Applikation von Nebennierenrindenhormonen in physiologischen Dosen die Phagozytose durch das RES. Derselbe Effekt kann durch ACTH-Applikation erzielt werden (78). Parallel zur Erhöhung des Plasmacorticosteroidspiegels nimmt der Opsoningehalt des Blutes ab, und beide Parameter kehren gleichzeitig zur Norm zurück (86). Da eine Beeinflussung des RES

durch Corticosteroide in vitro bisher nicht gelungen ist, muß angenommen werden, daß die Wirkung dieser Hormone auf das RES über ein vermindertes Opsoninangebot indirekt erfolgt, entweder durch verstärkten Abbau oder durch verminderte Bereitstellung im Blut. Eine Zunahme der Corticosteroide nach Verbrennungen läßt sich auf den durch Schmerzen ausgelösten neurogenen Schock zurückführen, so daß eine Beteiligung dieser Hormone an der RES-Depression in der Frühphase der Verbrennungskrankheit möglich ist. Da es auch nach Toxingabe zu schockähnlichen Zuständen kommen soll (27), könnte dieser Mechanismus auch bei der toxininduzierten Form der RES-Depression beteiligt sein. Unter der Annahme, daß toxin- und nativinduzierte RES-Depression Folge eines Endotoxinschocks sind, könnten die Corticosteroide ebenfalls eine Rolle spielen. Der mögliche Einfluß der Streßsituation durch den Injektionsvorgang bzw. durch die Narkosebehandlung konnte durch gleichartige Behandlung der Kontrolltiere in Form der Kochsalzinjektion eliminiert werden. Alleiniger Auslöser der RES-Depression in Streßsituationen können die Corticosteroide jedoch nicht sein, da auch bei adrenalektomierten Tieren nach Traumen die Phagozytose signifikant abnimmt (85). Wegen fehlender Messungen kann über die Beteiligung der Corticosteroide bei der toxininduzierten RES-Depression keine endgültige Aussage gemacht werden. Auch für diese Messungen wären größere Versuchstiere notwendig gewesen.

Da das RES unter physiologischen Bedingungen am Abbau der Gerinnungsfaktoren beteiligt ist, könnten Veränderungen am Gerinnungssystem die RES-Funktion ebenfalls beeinflussen. Über hemmende Einflüsse des Heparins auf die RES-Funktion wurde berichtet (31, 49), wobei es sich um eine kompetitive Hemmung elektronegativer Teilchen an den Rezeptoren der Makrophagen handeln soll. Im Zusammenhang mit den nach Verbrennungen (18, 50) und nach Gabe von Verbrennungstoxin (12) auftretenden intravaskulären Gerinnungsstörungen könnte eine Veränderung am Gerinnungssystem am Mechanismus der RES-Depression beteiligt sein. Es sei noch darauf hingewiesen, daß von anderen Autoren beschriebene, chemisch differente Verbrennungstoxine ebenfalls Veränderungen am Gerinnungssystem hervorrufen (30, 38).

Zusammenfassend kann man sagen, daß bis heute trotz einer Vielzahl von Untersuchungen das Phänomen der RES-Depression nicht in befriedigender Weise geklärt werden konnte. Die Ergebnisse weisen auf ein multifaktorielles Geschehen hin. Eine irreversible Schädigung einer oder mehrerer für die Phagozystose essentieller Faktoren darf jedoch ausgeschlossen werden, da sonst die schnelle Erholung dieses Systems, wie sie in allen Versuchen übereinstimmend beobachtet wird, nicht erklärbar wäre. Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Verbrennungen gilt auch heute noch Koslowskis Formulierung aus dem Jahre 1971 über die RES-Funktion nach einem Verbrennungstrauma: " Die Fähigkeit des RES zur Phagozytose ist nach schweren Verbrennungen schon frühzeitig geschwächt, wodurch wissen wir nicht. Vielleicht liegt hier ein Angriffspunkt für Verbrennungstoxine, deren Existenz wahrscheinlich, deren chemische Natur und Wirkung aber nach wie vor problematisch sind." Unsere Ausführungen legen nahe, daß zumindest das hier untersuchte Verbrennungstoxin nicht der entscheidende Faktor für diese RES-Depression ist.

5.4. RES-Depression und Infektion

Für einen neuen Therapieansatz der Verbrennungskrankheit interessiert die Frage, ob eine durch Verbrennungstoxine bewirkte Minderfunktion des RES Ursache der generalisierten Sepsiszustände ist. Rittenburg fand kurz vor dem Tode von verbrannten Versuchstieren einen starken Abfall der RES-Funktion (67). Dieselben Befunde konnten an mehreren Verbrennungspatienten erhoben werden (97). Da dieser Abfall jedoch nur dann beobachtet wird, wenn der Tod 2 Wochen oder später nach dem Verbrennungstrauma auftritt, bei Versuchstieren, die früher dem Trauma erliegen jedoch nicht nachweisbar ist, kann ein Versagen des RES nicht immer Ursache der septischen Komplikationen sein. Müller konnte zeigen, daß die Sterblichkeit nach künstlicher Pseudomonasinfektion steigt, wenn den Versuchstieren zuvor eine subletale Dosis des Verbrennungstoxins verabreicht wurde. Eine entsprechende Dosis des Nativ hatte im Gegensatz dazu keinen Einfluß auf die Sterblichkeit (53). Da das Nativ, wie unsere Versuche zeigen, eine stärkere

RES-depressorische Wirkung besitzt als das Toxin, kann für diesen Effekt nicht die Depression des RES durch das Verbrennungstoxin verantwortlich sein. Der erhöhten Sterblichkeit muß deswegen ein anderer Mechanismus als Veränderungen der RES-Funktion zu Grunde liegen.

Im Zusammenhang mit der notwendigen langen Latenzperiode zwischen dem Verbrennungstrauma und dem Auftreten einer RES-Depression bei den Untersuchungen von Rittenburg (67) könnte vermutet werden, daß die entscheidende Wirkung des Toxins nicht direkt auf die RES-Zellen erfolgt, sondern über eine Schädigung der Vorstufen der Makrophagen und damit über eine Hemmung der Zellerneuerung des RES-Systems. Eine Hemmung der Knochenmarksproliferation durch das Toxin konnte nachgewiesen werden (5, 6). Dieser Vermutung widerspricht jedoch der plötzliche, starke Abfall der RES-Funktion. Bei gestörter Zellerneuerung müßte ein allmählicher Abfall der RES-Funktion entsprechend dem Absterben alter Makrophagen auftreten. Daher erscheint eher wahrscheinlich, daß RES-Depression und Tod in der Spätphase der Verbrennungskrankheit Folgen einer anderweitigen Störung des Organismus sind und nicht Ursache und Wirkung darstellen. Dann könnte sogar die auftretende Sepsis über eine Endotoxinwirkung Ursache der RES-Depression sein, und nicht umgekehrt, wie bisher vermutet.

Auch Balch (8) widerspricht der Annahme eines ursächlichen Zusammenhanges zwischen einer gestörten RES-Funktion und dem Auftreten septischer Komplikationen. Er meint, daß die Persistenz von Bakterien im Blutstrom verbrannter Patienten von großer prognostischer Bedeutung sei, daß dies aber nicht unbedingt bedeute, daß Blut oder RES weniger bakterizid wirken. Er vermutet vielmehr ein Versagen lokaler Kontrollmechanismen für das Bakterienwachstum in der Verbrennungswunde als Ursache.

Mit diesen Ausführungen wird nicht in Frage gestellt, daß eine Störung der RES-Funktion das Auftreten septischer Komplikationen begünstigt. Nach unseren Ergebnissen erscheint es jedoch unwahrscheinlich, daß eine gestörte RES-Funktion der entscheidende Faktor für den letalen Ausgang der Verbrennungskrankheit darstellt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde die Wirkung eines - in der Literatur bekannten - aus verbrannter Mäusehaut isolierten Verbrennungstoxins und dessen nativer Vorstufe aus unverbrannter Haut auf die Funktion des RES. Für Untersuchungszwecke wird eine neue Markierungsmethode mit 125-Jod vorgestellt. Im Versuch konnte mit dieser Methode nachgewiesen werden, daß dieses Verbrennungstoxin nach i.p.-Injektion vom RES phagozytiert wird, wobei die Leber - als wichtigstes RES-Organ - den größten Anteil aufnimmt.

8 Stunden nach Applikation der beiden Substanzen ist eine signifikante Depression des RES nachweisbar, die dosisabhängig ist. Diese RES-Depression wird vorwiegend durch eine stark verminderte Phagozytose der Kupffer'schen Sternzellen der Leber bestimmt. Die RES-Zellen der Milz werden durch diese Substanzen in ihrer Funktion kaum beeinträchtigt. Bei gleicher Dosierung bewirkt das Nativ eine stärkere RES-Depression als das Toxin. Die Wirkungsmechanismen der beiden Substanzen konnten nicht geklärt werden.

Es wird vermutet, daß die frühe RES-Depression wenige Stunden nach dem Verbrennungstrauma schockinduziert ist, und nicht identisch ist mit der im Versuch durch das Verbrennungstoxin bewirkten RES-Depression. Die Spezifität dieses Verbrennungstoxins wird aufgrund der gleichartigen Wirkung des Nativ in Frage gestellt.

Die im Versuch beobachtete Alteration des RES durch das " Verbrennungstoxin " scheint für die gesteigerte Infektanfälligkeit von Verbrennungspatienten nicht die entscheidende Rolle zu spielen.

7. MESSWERTE

7.1. Versuchsreihe I

I.1. Gruppe A

Jedes Versuchstier erhielt 50 µl 51-Cr.RBC = 138 747 cpm

Meßwerte 1,5 min post injectionem

Tier	Leber	Milz	Nieren	Lunge
1	86 058	2 334	1 336	15 725
2	63 093	1 215	908	19 567
3	24 982	376	668	6 869
4	19 501	320	669	3 279
5	47 499	655	554	17 492
6	50 613	991	616	19 214
7	23 445	471	558	11 610
$\bar{x}$	42 269	909	758	13 394
s	28 494	709	281	6 354

I. 2 Gruppe B

Jedes Tier erhielt 50 µl 51-Cr-RBC = 747 cpm

Meßwerte 5 min post injectionem

Tier	Leber	Milz	Nieren	Lunge
1	113 850	1 975	1 081	8 913
2	76 299	1 759	1 838	18 850
3	56 641	1 634	1 148	13 217
4	73 625	1 628	1 026	8 715
5	76 444	2 236	1 184	1 030
6	57 891	1 105	897	9 276
7	70 701	1 809	691	11 644
$\bar{x}$	75 064	1 735	1 124	10 235
s	18 988	350	357	5 398

I. 3 Gruppe C

Jedes Tier erhielt 4,7 mg Toxin i.p. = 720 310 cpm
und 50 µl 51 Cr-RBC = 138 747 cpm
Meßwerte 1,5 min post injectionem

Tier	Leber	Milz	Nieren	Lunge	Thymus
1	108 574	26 995	22 801	2 002	5 674
	20 133	1 390	1 466	29 876	
2	159 714	73 973	14 618	6 738	8 895
	19 063	590	689	19 611	
3	94 331	9 982	5 667	2 108	4 919
	21 823	741	969	28 364	
4	109 251	10 483	7 046	2 508	8 204
	16 173	267	902	26 108	
5	87 011	7 814	4 041	1 899	1 866
	29 740	760	1 507	28 849	
6	185 364	39 144	8 357	2 902	3 196
	30 707	719	1 520	30 873	
7	120 727	14 871	6 516	3 341	7 506
	17 672	549	1 204	30 252	
8	67 399	7 265	7 759	1 979	5 280
	28 487	681	2 181	33 787	
9	124 840	19 820	6 948	2 661	5 371
	34 798	1 369	1 536	26 597	
10	134 227	7 482	7 180	2 484	6 358
	18 164	600	556	23 367	
$\bar{x}$	119 144	21 783	9 093	2 863	5 727
s	34 687	21 032	5 549	1 437	2 161
$\bar{x}$	23 676	767	1 253	27 768	
s	6 608	352	487	4 056	

I. 4 Gruppe D

Jedes Tier erhielt 4,7 mg Toxin = 720 310 cpm
und 50 µl 51-Cr-RBC = 138 747 cpm
Meßwerte 5 min post injectionem

Tier	Leber	Milz	Nieren	Lunge	Thymus
1	141 039	27 933	8 627	2 914	7 232
	56 544	2 766	2 156	15 588	
2	140 529	20 459	7 132	2 567	14 142
	32 436	1 685	821	18 234	
3	155 673	16 115	6 576	2 550	6 565
	60 142	1 647	670	16 781	
4	75 258	6 794	6 977	2 611	3 968
	80 070	2 629	2 304	17 326	
5	129 181	10 246	7 661	2 511	10 286
	26 466	730	1 654	9 785	
6	139 557	12 632	9 110	2 576	3 884
	61 989	1 632	1 438	18 986	
7	40 672	2 625	2 438	1 170	5 403
	41 296	1 178	548	12 771	
8	69 950	6 721	5 527	1 378	4 243
	63 507	1 702	1 352	11 518	
9	113 824	22 337	6 890	4 221	8 563
	44 582	1 539	1 023	14 330	
$\bar{x}$	111 720	13 985	6 773	2 500	7 143
s	40 026	8 367	1 945	879	3 416
$\bar{x}$	51 892	1 723	1 330	15 035	
s	16 997	637	627	3 162	

I. 5 Gruppe E

Jedes Tier erhielt 4,7 mg Toxin = 720 310 cpm

Meßwerte 9 Stunden nach Gabe des Toxins

Tier	Leber	Milz	Nieren	Lunge	Thymus
1	97 728	13 909	7 229	2 250	7 743
2	36 555	4 792	2 974	430	1 201
3	179 487	66 460	9 395	1 847	3 177
4	127 226	19 773	8 015	1 740	3 367
$\bar{x}$	110 249	26 234	6 903	1 567	3 872
s	59 637	27 517	2 768	789	2 760

7. 2. Versuchsreihe II

II. 1. Gruppe F

Jedes Tier erhielt 2 ml NaCl
und 50 µl 51-Cr-RBC = 92 967 cpm

Tier	O,5 min	1,5 min	4 min	Leber	Milz
1	704	386	176	61 073	788
2	891	716	338	55 706	731
3	912	525	278	48 959	432
4	642	514	333	41 558	659
5	649	584	210	61 865	555
6	635	384	172	57 413	731
7	622	399	153	67 321	899
8	797	629	238	65 469	1 438
9	712	520	200	59 971	960
10	640	477	258	50 879	1 294
11	616	451	174	72 691	690
12	519	333	154	56 501	630
13	633	460	273	49 966	1 003
$\bar{x}$	690	491	227	57 644	832
s	113	108	61	8 467	286

II. 2 Gruppe G

Jedes Tier erhielt 5 mg Toxin

und 50 µl 51-Cr-RBC = 92 967 cpm

Meßwerte 8 Stunden nach Gabe des Toxin

Tier	0,5 min	1,5 min	4 min	Leber	Milz
1	937	1200	402	47 609	382
2	912	771	346	35 263	620
3	1129	1145	346	49 650	493
4	1346	1036	315	44 274	643
5	1036	791	328	31 230	722
6	858	714	406	26 818	518
7	794	620	281	19 753	328
8	1234	1009	613	39 098	467
9	840	652	159	44 747	497
10	1050	754	267	51 789	742
11	742	790	198	41 916	690
12	846	909	480	33 468	424
$\bar{x}$	977	866	345	38 801	544
s	186	191	122	9 741	137

II. 3 Gruppe H

Jedes Tier erhielt 5 mg Nativ
und 50 µl 51-Cr-RBC = 92 967 cpm
Meßwerte 8 Stunden nach Gabe von Nativ

Tier	0,5 min	1,5 min	4 min	Leber	Milz
1	1 479	1 097	653	35 615	681
2	1 001	1 107	854	23 883	736
3	1 090	929	809	23 743	310
4	1 485	1 543	1335	13 105	456
5	911	721	308	40 602	535
6	1 176	925	310	42 605	663
7	1 138	996	608	33 763	509
8	957	921	828	26 994	679
9	1 292	1 108	1 186	8 861	739
$\bar{x}$	1 170	1 039	766	27 686	590
s	212	226	348	11 655	146

8. LITERATURVERZEICHNIS

1 Allgöwer, M. t. al.
Study of burn toxins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 150, 807-815 (1968)

2 Altura, B.M., Hershey, S.G.
RES phagocytic function in trauma and adaptation to experimental shock
Am. J. Physiol. 215, 1414-1419 (1968)

3 Arturson,G.
Pathophysiological aspects of the burn syndrome with special reference to liver injury and alteration of capillary permeability
Acta chir. scand. Suppl. 274, 5-54 (1961)

4 Aschoff,L.
Das RES
Ergebn. Inn. Med. Kinderheilkunde 26, 1-118 (1924)

5 Asko-Seljavaara,S.
Altered cell-proliferation in different organs in burned mice
Scand. J. Plat. Reconstr. Surg. Suppl. 13, 1-21 (1975)

6 Asko-Seljavaara,S.; Sundell,B.;Rytömaa,T.
The effect of early excision on bone-marrow cell growth in burned mice
in Burns 3; 140-145 (1976)

7 Avdakoff;V.
Pathological modification of tissues by burns
St. Petersburg Med. Vestnik 16, 4 (1876)

8 Balch,H.h.; Walters,M.; Kelley,D.
Resistance to infection in burned patients
Ann. Surg. 157, 1-19 (1963)

9 Banaszak,E.H.; Kampine,J; Smith,J.J.
Circulatory effects on RES depression in the dog
Am. J. Physiol. 209, 532-538 (1965)

10 Baxter,C.R.
The current status of burn research
J. Trauma 14, 1-8 (1974)

11 Benacerraf,B.; Biozzi,G.; Cuendet,A.; Halpern,B.N.
Influence of portal blood flow an partial hepatectomy on the granulopectic activity of the RES
J. Physiol. London 128, 1-8 (1955)

12 Bihr,F.
Wirkung einer toxischen Substanz aus verbrannter Mäusehaut auf den Kohlenhydratstoffwechsel im Muskel des Kaninchens
Dissertationsarbeit aus dem Fachbereich Klinische Medizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1980)

13 Biozzi,G.; Benacerraf,B.; Halpern,B.N.
Quantitative study of the granulopectic activity of the RES II
Brit. J. Exptl. Pathol. 34, 441-457 (1953)
14 Biozzi,G., Halpern,B.N.; Benacerraf,B.; Stiffel,C.
Phagocytic activity of the RES in experimental infections
in Physiopathology of the RES, Blackwell,S. 204 (1957)
15 Bjornson,A.B.; Alexander, J.W.
Alterations of serum opsonsins in patients with servere thermal injury
J. Lab. Clin. Med. 83, 372-382 (1974)
16 Bloch, E.H., Mc Cuskey,R.S.
Biodynamics of phagocytosis: an analysis of the dynamics of phagocytosis in the liver by in vivo microscopy
in Kupffer cells and other liver sinusoidal cells
E.Wisse und D.L. Knook eds. 21-32
Elsevier /North-Holland Biomedical Press,Amsterdam (1977)
17 Boltz-Nitulescu,G.
Makrophagen
Naturwissenschaftl. Rundschau 8, 319-329 (1978)
18 Borgolte,H.; Dohmen,M.
Thrombo-hämorrhagisches Syndrome bei der Verbrennungskrankheit
Langenbecks Arch. Chir. 329, 889 (1971)
19 Bouveng,R.; Schildt,B.; Sjöqvist.J.
Estimation of RES-phagocytic and catabolic function in man by use of 125J-labelled micro-aggregates of human serum albumin
J. RE. Soc. 18, 151-159 (1975)
20 Brauer,R.W.
Liver circulation and function
Physiol. Rev. 43, 115-213 (1963)
21 Larr, J.
The Kupffer cell - an overview
in Kupffer cells and other liver s nusoidal cells
E.Wisse und D.L. Knook eds. 355 - 364
Elsevier /North-Holland Biomedical Press,Amsterdamm (1977)
22 Converse, J.M.;et.al.
RES function in servere thermal injury
Surg. Forum 22, 493-495 (1971)
23 Cornell,R.P.;Saba, T.M.
Humoral control of colloid clearance by the RES in dogs
Am. J. Physiol. 225, 1300-1305 (1973)
24 Crofton, R.W.; Diesselhoff-den Dulk, M.M.C.; van Furth,R.
The origin, kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state
J. Exp. Med. 148,1, 1-17 (1978)
25 Cueni,L.B.; Allgöwer,M.; Schoenenberger,G.A.
Isolierung und physikalisch-chemische Charakterisierung eines Verbrennungstoxins aus der Mäusehaut
Z. ges. exp. Med. 156,2, 110-128 (1971)

26 Di Luzio,N.R., Wooles,N.R.
Depression of phagocytic activity and immune response by methyl palmitate
Am. J. Physiol. 206, 939-943 (1964)
27 Droste, O.
Die Wirkung einer toxischen Substanz aus verbrannter Mäusehaut auf verschiedene Serumparameter des Kaninchens unter dem Aspekt einer membranschädigenden Wirkung.
Dissertationsarbeit aus dem Fachbereich Klinische Medizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1979)
28 Fjellström,K.E.; Arturson,C.
Complement active serum proteins in clinical burns
in Second International Congress on Research in Burns
Edinburgh S.68-69 (1965)
29 Förster,O.
Zellmembranantigene von Makrophagen und ihre Beziehung zu anderen Oberflächenstrukturen
Der Krankenhausarzt 52, 45-51 (1979)
30 Fox,C.L.; Holder,I.A.; Malin,L.L.
Toxic thromboplastic extracts of skin; potential role in thermal injury
JAMA 187, 655-658 (1964)
31 Frimer,M.
Versuche über den Mechanismus der Speicherung von intravenös injizierten Fremdkolloiden im RES
Med. Exptl. 9, 173-177 (1963)
32 Gray,S.J.; Sterling,K.
The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium
J. Clin. Invest. 29, 1604-1613 (1950)
33 Hadding,U.
Das Komplement
Medizin in unserer Zeit 1, 23-32 (1980)
34 Hakim,A.A.
Thermal injury: Release of a cytotoxic factor
Experientia 29, 865-867 (1973)
35 Halpern,B.N.; Biozzi,G.; Benacerraf,B.; Stiffel,C.
Phagocytosis of foreign red cells by the RES
Am. J. Physiol. 189, 520-526 (1957)
36 Hanback, I.D.; Rittenburg, M.S.
Response of the RES in thermal injury
Surg. Forum 16, 47-50 (1965)
37 Hoffmann,G.
Abriß der Laboratoriumstierkunde S. 210 (1961)
38 Holder,I.A.; Malin, L.L.; Fox,C.L.
Hypercoagulability after thermal injuries: simulation by injection of skin extracts
Surgery 54, 316-321 (1963)
39 Jenkin,C.R.; Rowley,D.
The role of opsonsins in the clearance of living and inert particles by cells of the RES
J.Exp. Med. 114, 363-374 (1961)

40 Jeunet,F.S.; Good,R.A.
Re-function in the isolated perfused liver.
I. Study of rates of clearance, role of plasma
factor an the nature of RE-blockade
J. RE-Society 4, 351-369 (1967)
41 Kallee,E.
Die Inselzellhormone: Radiojodiertes Insulin
Diabetes mellitus Bd.1 , 247-255 (1969)
42 Kaplan,J.E.; Saba,T.M.
Humoral deficiency and RE-depression after
traumatic shock
Am. J. Physiol. 230, 7-14 (1976)
43 Kirov,A.; Hahn,H.; Müller,F.; Koslowski,L.; Roth,C.
Schmidt, K.H.
Therapeutic effects of Corynebacterium parvum in
experimental burn disease of mice
in Burns 6; 45-47 (1981)
44 Koslowski,L.
Die Verbrennungskrankheit
Dtsch. med. Wschr. 88, 233-239 (1963)
45 Koslowski,L.
Experimentelle Untersuchungen zur Toxinwirkung
bei Verbrennungen im Schrifttum der letzten 100
Jahre
Z. Prax. Klin. Forsch. Präv. Bgtacht. Rehabil.
5, 61-63 (1970)
46 Koslowski, L.
Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit im
Lichte neuerer Forschungsergebnisse
Langenbecks Arch. Chir. 329, 880-888 (1971)
47 Kremer,B.; Schoelmerich,J.
Verbrennungstoxine. "Ei des Kolumbus" in der
Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit
Langenbeck Preis (1981)
48 Langevoort, H.L.; Cohn, Z.A.; Hirsch,J.G.; Humphrey,J.H.
Spector,W.G.; van Furth, R.
The nomenclature of mononuclear phagocytic cells-
proposal for a new classification
in Mononuclear Phagocytes R. van Furth Ed.
Blackwell Sci. Publ. Oxford 1-6 (1970)
49 Mac Intyre,W.J.; Shapiro, R.L.; Shapiro, D.I.,
The inhibitory effect of heparin on the clearance
of colloidal gold by the RES
J. Lab. Clin. Med. 66, 999-1000 (1965)
50 McManus,W.F.; Eurenius, K.; Pruitt,B.A.
Disseminated intravascular coagulation in burns
J. Trauma 13, 416-422 (1973)
51 Migay, F.J.; Petroff, J.R.
Über experimentell erzeute Eisenablagerungen
und vitale Karminfärbung bei Kaninchen
Arch. mikr. Anat. 97, 54-71 (1923)
52 Morrow, S.H.; Di Luzio, N.R.
The fate of foreign red cells in mice with
altered reticuloendothelial function
Proc. Soc. Exp. Med. 119, 647-652 (1962)

53 Müller,W.; Allgöwer,M,; Städtler,K.; Burkhart,F., Schoenenberger,G.A.
Specific impairment of host defense for pseudomonas infection in mice by a burn toxin
Res. Exp. Med. (Berlin) 162, 153-160 (1974)

54 Munster, A.M.
Alternations of the host defense mechanism in burns
Surg. Clin. North Am 50, 1217-1225 (1970)

55 Munster, A.M. et al.
The effect of thermal injury on serum immunoglobulins
Annals of surgery 172,, 965-969 (1970)

56 Murray, I.M.
The mechanism of blockade of the RES
J. Exptl. Med. 117, 139-147 (1963)

57 Nelson,D.S.
Immune adherence in Complement,
a Ciba Foundation Symposion 1964, 222-241 (1965)

58 Nicol,T.; Bilbey,D.L.J.
The effect of various steroids on the phagocytic activity of the RES
in: Heller, J.H. (ed) Reticuloendothelial structure and function

59 Norman,S.J.
The effect of portal venous perfusion on phagocytosis by the liver
J. Re. Soc. 3, 356-357 (1966)

60 Norman,S.J.
RES function. VI Experimental alternations influencing the correlation between portal blood flow and colloid clearance
J. Re. Soc. 13, 47-60 (1973)

61 Perkins,E.H.; Leonard, M.R.
Specifity of phagocytosis as it may relate to antibody formation
J. Immunol. 90, 228-237 (1963)

62 Petroff, J.R.
Zur Frage der Speicherung des kolloidalen Silbers im reticuloendothelialen Systems
Z. ges. exp. Med. 42, 242-246 (1924)

63 Phillips, A.W.; Cope,O.
Analysis of the effect of burn therapy on burn mortality
in Research in burns (C.P. Artz ed) 1

64 Ramirez,A.T.; Tamondong,C.T.; Del Castillo,A.N.L. Dino, B.R.
Probite analysis of burn death in a development
Surgery 68, 813-816 (1970)

65 Rapaport,F.T.; Ball,S.; Converse,J.M.
Experimental alterations in host resistance to thermal injury
Surg. Forum 21, 519-521, (1970)

66 Riggi,S.J.; Di Luzio, N.R.
Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan
Am J. Physiol. 200, 297-300 (1961)

67 Rittenburg,M.S.; Hanback,L.D.
Phagocytic depression in thermal injury
J. Trauma 7, 523-539 (1967)
68 Roth,C.
Endotoxinähnliche Aktivität einer aus verbrannter Mäusehaut isolierter Substanz. Letalität und Hepatotoxizität in Abhängigkeit vom RE-Stimulationsgrad durch Corynebacterium parvum. Eine vergleichende Untersuchung an der weißen Maus.
Dissertationsarbeit aus dem Fachbereich Klinische Medizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1982)
69 Saba,T.M.
Mechanism mediating reticuloendothelial depression after surgery
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1132-1136 (1970)
70 Saba,T.M.
Physiology and physio-patholody of the RES
Arch. Intern. Med. 126, 1031-1052 (1970)
71 Saba,T.M.
Effect of surgical trauma on the clearance and localization of blood-borne particulate matter
Surgery 71, 675-685 (1972)
72 Saba,T.M.; Di Luzio, N.R.
Re-blockade and recovery as a function of opsonic activity
Am. J. Physiol. 216, 197-205 (1969)
73 Schick,G.
Verhalten von ß-Hydroxybutyrat, Acetacetat und der Serumcholinesterase nach tierexperimenteller Verbrennung mit 100 C und 250 C
Dissertationsarbeit aus dem Fachbereich Klinische Medizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1975)
74 Schildt, B.E.
Disappearance of i.v. injected 51Cr-RBC from circulation as a possible measure of RES-function in mice
Acta Chir. Scand. 136, 351-357 (1970)
75 Schildt,B.E.
Function of the RES after thermal and mechanical trauma in mice
Acta Chir. Scand. 136, 359-364 (1970)
76 Schildt,B.E.
Liver blood flow in traumatized mice
Acta Chir. Scand. 138, 59-68 (1972)
77 Schildt,B.E.; Bouveng,R.
Effect of burning on hepatic phagocytosis as studied in vitro
Life Sci. 10, 397-404 (1971)
78 Schildt,B.E.; Löw,H.
Relationship between trauma, plasma cortisterone and reticuloendothelial function in anaesthetized mice
Acta Endocrinol. 67, 141-146 (1971)
79 Schoenberg, M.D.; Gilman,P.A.; Mumaw,V.R.; Moore,R.D.
The phagocytosis of uniform polystyrene latex particles (PLP) by the RES in the rabbit
Brit. J. Exp., Path. 42, 486-495 (1961)

80 Schoenenberger,G.A.
Burn toxins isolated from mouse and human skin
Monogr. Allergy 9, 72-139 (1975)
81 Schoenenberger,G.A.; Städtler,K.
Verbrennungskrankheit-Toxinwirkung oder Infektionsfolge ?
Der Chirurg 45, 20-28 (1974)
82 Schoenenberger,G.A.; Allgöwer,M.; Kremer,B.; Städtler,K.
Neue Gesichtspunkte zur Verbrennungskrankheit
Der Chirurg 47, 582-588 (1976)
83 Schoenenberger,G.A.; Allgöwer,M.; Cueni,B.; Eppenberger,U.; Städtler,K.E.
Isolation, biological and antigenic properties of a specific toxin formed in thermally altered mouse skin
Europ. J. Clin. Invest. 2, 154-162 (1972)
84 Schwick,H.G.; Bräuer,D.
Exempla immunologica
ed. Behringwerke, Med. Information Frankfurt (1980)
85 Scovill,W.A.; Saba,T.M.
Response of the opsonic and phagocytic system to trauma in adrenalectomized animals
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, 192-197 (1973)
86 Scovill,W.A.; Saba,T.M.
Hepatic RE-host defense failure following surgical trauma
Arch. Surg. 110, 954-959 (1975)
87 Sevitt,S.
Toxaemia of burns
Mod. Trends Plast. Surg. 2, 126-149 (1966)
88 Städtler,K.; Allgöwer,M.; Cueni,L.B.; Schoenenberger,G.A.
Pathophysiologische Untersuchungen an einem Verbrennungsmodell der Maus
Res. Exp. Med. 158, 23-33 (1972)
89 Städtler,K.; Allgöwer,M.; Cueni,L.B.; Schoenenberger,G.A.
Immuntherapeutische Untersuchungen mit Verbrennungstoxin am Modell der Maus
Res. Exp. Med. 158, 34-42 (1972)
90 Steinmann,R.M.; Cohn,Z.A.
The interaction of particulate horseradish peroxidasa (HRP)-Anti HRP immune complexes with mouse peritoneal macrophages in vitro
J. Cell Biol. 55, 616-634 (1972)
91 Thomas,J.A.
Conception du systeme reticulo-histiocytaire: La regulation de l'etat histiocytaire et la specifite cellulaire
Rev. Hematol. 4, 639-654 (1949)
92 van Furth,R.; Cohn,Z.A.
The origin and kinetics of Mononuclear Phagocytes
J. Exp. Med. 128, 415-433 (1968)

93 Vernon-Roberts, B.
The distribution and morphology of macrophages
in The macrophage
University-Press Cambridge 5-31 (1972)
94 von Jansco, N.
Die Untersuchung der Funktion des Retikuloendothels
mit Durchströmungsversuchen
Z. ges. exp. Med. 64, 256-267 (1929)
95 Vonnahme, F.J.
A scanning electron microscopic study of
Kupffer cells in the monkey liver
in Kupffer cells and other liver sinusoidal cells
E. Wisse und D.L. Knook eds. 103 - 108
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977)
96 Wagner, H.N.; Jio, M.
Studies of the RES. III Blockade of the RES in man
J. Clin. Invest. 43, 1525-1532 (1964)
97 Warr, G.W.; Sljivic, V.S.
Studies on the organ uptake of 51-Cr labelled
sheep erythrocytes in the evaluation of stimulation
of RES phagocytic function in the mouse
J. RE Soc. 16, 193-203 (1974)
98 Wertheim, G.
Über die Veränderung des Blutes bei Verbrennungen
und Verbrühungen
Wien. Med. Presse 9, 308,605 (1868)
99 Wisse, E.
Kupffer cell reaction in rat liver under
various conditions as observed in the electron
microscope.
J. Ultrastruct. Res. 46, 499 (1974)
100 Wisse, E.
Ultrastructure and function of Kupffer cells
and other sinusoidal cells in the liver
in Kupffer cells and other liver sinusoidal cells
E. Wisse und D.L. Knook eds. 33 - 60
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977)
101 Wooles, W.R.; Di Luzio, N.R.
The phagocytic and proliferative response of the
RES following glucan administration
J. Re Soc. 1, 160-169 (1964)
102 Zellner, P.R.; Schlayer, G.; Möller, I.; Köhler, G.
Der Verlauf der Immunglobuline G und M bei
Schwerverbrannten
Der Chirurg 48, 516-519 (1977)

LEBENSLAUF

Am 29. Juli 1953 wurde ich, Ekkehard Lukas, als Sohn des Lehrers Erwin Lukas und der Hausfrau Marianne Lukas in Stuttgart geboren.
1960 trat ich in die Grundschule ein und wechselte nach dem 4. Schuljahr auf das Hegel-Gymnasium in Stuttgart-Vaihingen über, wo ich 1972 das Abitur des neusprachlichen Zuges ablegte.
Im Oktober 1972 begann ich das Studium der Agrarbiologie an der Universität von Hohenheim, wechselte jedoch nach einem Semester zum Studium der Medizin an der gleichen Hochschule über.
1974 erfolgte der Wechsel an die Universität Tübingen, wo ich sämtliche Examina ablegte.
Das Praktische Jahr absolvierte ich am Städtischen Krankenhaus Sindelfingen mit dem Wahlfach Gynäkologie.
Am 10.04.1980 legte ich den schriftlichen Teil und am 23.04.1980 den mündlichen Teil des 3. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung ab.
Meine ärztliche Tätigkeit nahm ich am 15.05.1980 als Assistenzarzt an der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Sindelfingen auf. Diese Tätigkeit mußte ich zur Ableistung des Wehrdienstes von März 1981 bis Mai 1982 unterbrechen. Bei der Bundeswehr war ich als Musterungsarzt, Truppenarzt sowie Ausbilder für Sanitäter tätig.
Nach meiner Eheschließung am 14.05.1982 habe ich meine Tätigkeit in Sindelfingen im Juni 1982 wiederaufgenommen.
Meine Doktorarbeit begann ich im März 1977 an der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen und schloß sie im Februar 1983 ab.